

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**MICROPROPAGACIÓN IN VITRO DE PIÑA,
ANANAS COMOSUS (L.) Merr Var. MD2
(BROMELIACEAE) BAJO UN SISTEMA DE
BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL**

TESIS

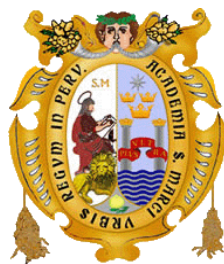
Para optar el Título Profesional de Biólogo con mención en Botánica

AUTOR

Cynthia Isabel Llanos Buendía

Lima – Perú

2015



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS

MICROPROPAGACIÓN *IN VITRO* DE PIÑA, *ANANAS COMOSUS* (L.) Merr Var. MD2 (BROMELIACEAE) BAJO UN SISTEMA DE BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL

Tesis para optar al Título Profesional de Biólogo con mención en
Botánica

Bach. CYNTHIA ISABEL LLANOS BUENDIA

Asesora: Mery Luz Suni Ninataype

Lima – Perú

2015

ABREVIATURAS

MS	Medio de Cultivo Murashigue y Skoog
ANA	ácido α -Naftalen acético
BAP	Bencilaminopurina
IBA	Ácido Indol butírico
KIN	Kinetina
BIT	Sistema de Inmersión Temporal (Biorreactores)

INDICE GENERAL

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	4
2.1 Antecedentes	4
2.1.1 Origen y distribución geográfica	4
2.1.2 Importancia económica	5
2.2 Producción y variedades cultivadas en el Perú	6
2.2.1 Producción	6
2.2.2 Zonas de producción mundial	8
2.2.3 Zonas productoras y variedades cultivadas en Perú	9
2.2.4 Principales variedades en el Perú	10
2.2.5 Algunas variedades cultivadas en el Mundo y Perú	10
2.3 Ubicación taxonómica	13
2.3.1 Morfología	14
2.3.2 Reproducción	17
2.4 Técnicas de propagación	17
2.4.1 Propagación convencional	17
2.4.2 Propagación por cultivo de tejidos	18
2.4.3 Sistema de Inmersión Temporal	18
III. OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo general	20
3.2 Objetivos específicos	20
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	21
4.1 Material Biológico	21

4.2	Método	21
4.3	Materiales de laboratorio	21
4.3.1	Materiales de vidrio, plástico y otros	22
4.3.2	Equipos	22
4.3.3	Medio de cultivo	22
4.4	Procedimiento	26
4.4.1	Primera etapa: Introducción de yemas de la corona de piña	26
4.4.2	Segunda etapa: Multiplicación del material obtenido en frascos	29
4.4.3	Tercera etapa: Multiplicación del material en biorreactores	30
4.5	Métodos estadísticos utilizados para el análisis de datos	31
V.	RESULTADOS	33
5.1	Primera etapa: Introducción de yemas de la corona de piña	33
5.2	Segunda etapa: Multiplicación del material obtenido en frascos	35
5.3	Tercera etapa: Multiplicación del material en biorreactores	39
VI.	DISCUSIÓN	43
VII.	CONCLUSIONES	47
VIII.	RECOMENDACIONES	48
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
X.	ANEXOS	54

RESUMEN

La piña (*Ananas comosus* (L.) Merrill) es uno de los principales frutales a nivel mundial, por ello es cultivada a fin de satisfacer las necesidades alimentarias de la población. Además constituye un importante sustento para las economías locales. Por tanto, el presente trabajo fue realizado con la finalidad de mejorar y establecer un protocolo de propagación *in vitro* de piña (*Ananas comosus* (L.) Merrill Var. MD2). Para la introducción de yemas se realizó 5 tratamientos de desinfección siendo más eficaz la concentración de lejía al 25 % por 15 min para la primera desinfección y 10 % por 10 min para la segunda desinfección. Para las etapas de introducción, multiplicación y el Sistema Automatizado de Inmersión Temporal (Biorreactores) se empleó el medio de cultivo que contiene sales y vitaminas Murashigue Skoog suplementado con Myo-inositol (100 mg. L^{-1}), sacarosa (20 g L^{-1}) como medio testigo y comparado en base a tratamientos hormonales de BAP-ANA y Kinetina-ANA-IBA. Se seleccionó la combinación de concentraciones BAP ($2,1 \text{ mg L}^{-1}$) - ANA ($0,3 \text{ mgL}^{-1}$), por presentar un índice de multiplicación mayor. En el Sistema Automatizado de Inmersión Temporal (Biorreactores) se aplicó frecuencias de inmersión de 3 min cada 3 horas por un periodo de seis a ocho meses, creciendo a una temperatura de $25 - 30 ^\circ\text{C}$, con un fotoperiodo de 11 o 12 horas diarias bajo luz blanca fluorescente que junto con el medio seleccionado dio lugar a una tasa de multiplicación de 11.

Palabras claves: piña, *in vitro*, BAP, ANA, inmersión temporal.

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

La tesis está dedicada a mis padres por el gran apoyo brindado durante mis estudios y la realización de esta, ya que todo lo que he logrado se lo debo a ellos, agradezco a Dios por lo recibido a lo largo de mi vida y a mi familia por confianza depositada en mí a pesar de las dificultades que se presentaron durante mi tiempo de estudiante y tesista.

Gracias a mi asesora por apoyo contribuido, al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria la Molina por las instalaciones brindadas y al proyecto en conjunto por la oportunidad para realizar mi tesis.

I. INTRODUCCIÓN

La especie *Ananas comosus* (L.) Merrill más conocida como la piña, pertenece a la familia de las Bromeliáceas, es una planta herbácea perenne cultivada por su fruto fragante y dulce, considerado como un cultivo de gran importancia a nivel mundial por sus propiedades culinarias y medicinales. Se propaga vegetativamente por brotes laterales presentando un porcentaje de multiplicación muy lento.

La piña es la tercera fruta tropical más importante en la producción mundial después del plátano y cítricos (FAO, 2008). El 70% de la piña producida en el mundo es consumida como fruta fresca en el país de origen, aunque también se consume procesada en mermeladas, yogures y enlatados.

En el Perú, la piña ocupa el 10° lugar en importancia económica entre los frutales cultivados. A nivel nacional existen 14,289 Ha sembradas con una producción 14840,7 kg/ ha (FAO, 2008). En la selva central se cultiva las variedades comerciales: Cayena lisa, Golden, Hawaina, Samba Chanchamayo y Lagarto. Todas destinadas para el mercado regional y nacional.

Los problemas que se presentan en la producción de las especies frutales como la piña, son muchos y generalmente se presentan en diferentes etapas, eso hace que el productor busque mejorar la calidad de la planta mediante el uso de plantas micropropagadas.

La piña presenta mayor demanda en la economía peruana, su producción se concentra principalmente en la selva central, y es también catalogado como un cultivo alternativo para sustituir las áreas de cultivo de hoja de coca utilizadas en mayor parte por el narcotráfico (DAI, 2007). Es por ello que la producción de semilla básica de calidad en este cultivo es de gran importancia agrícola, económica y social.

La gran importancia económica que tiene, ha impulsado la investigación biotecnológica en cultivo de tejidos, donde se ha logrado el mejoramiento de la producción, tasa de crecimiento , plantas libres de patógenos, etc.

El cultivo *in vitro* permite mejorar la eficiencia en la propagación de este cultivo, obteniéndose material de alta calidad genética y fitosanitaria (Daquinta & Benegas, 1997). Dentro de las técnicas de propagación *in vitro* se encuentra la micropropagación convencional, la embriogenesis somática (Daquinta et al., 1997) y el cultivo de inmersión temporal (Escalona et al., 1999).

Entre estos el Sistema de Inmersión Temporal por Biorreactores (BIT) tiene la ventaja de brindar una alta tasa de multiplicación, y proporciona una mayor calidad a la planta para la fase de aclimatación.

El crecimiento de los brotes en el cultivo *in vitro* es afectado por factores que han sido muy discutidos por Desjardins (1995), Ziv (1995) y Pospisilova *et al.*(1997). En el cultivo de inmersión temporal, la morfología y el comportamiento fisiológico de los brotes son muy semejantes a los que se presentan en condiciones *ex vitro*, debido a la mejora de la atmósfera del sistema (Teisson & Alvard, 1995).

Hasta el momento se ha investigado la relación de cambios fisiológicos que experimentan los brotes bajo una nueva forma de cultivo. Para el cultivo de la piña, se tienen estudios preliminares sobre el contenido de CO₂ y fotosíntesis *in vitro*, así como la asimilación de carbohidratos, aminoácidos y nitratos según Escalona *et al.* (1999). Estos autores sugieren que el aumento de la calidad intrínseca de los brotes de piña, en inmersión temporal, podría deberse a una mayor asimilación de nutrientes y no a un mejoramiento en el intercambio gaseoso. En general si la actividad fotosintética de los brotes fuera baja, sería un indicativo de que los brotes emplean más azúcares del medio, que fotosintetizan para la producción de la biomasa.

En el presente trabajo se evaluó la micropropagación de la piña desde su introducción de yemas de la corona hasta la propagación de plántulas bajo el Sistema de Inmersión Temporal, utilizando diferentes combinaciones de hormonas a fin de obtener una alta tasa de multiplicación.

II. MARCO TEÓRICO

2.1.- Antecedentes

2.1.1.- Origen y distribución geográfica

Ananas comosus (L) Merrill “piña”, es una especie nativa de América Tropical que tiene una distribución que comprende 15 a 30 grados de latitud sur hasta los 40 a 50 grados de longitud oeste, en particular el sur de Brasil, Paraguay y el norte de Argentina. La piña es originaria de América del Sur, de la región de Mato Grosso, entre Uruguay y Brasil. De ahí se extendió a América Central y el Caribe. Durante el siglo XVI llegó a Asia y África, llevado por los navegantes españoles (Collins, 1960).

Cristóbal Colón la descubrió en noviembre de 1493, durante su segundo viaje a América, en la Isla de Guadalupe. Exploradores posteriores vieron piñas creciendo en todos lados cerca de las costas tropicales de América (Samson, 1991).

En 1730 la corte de Luis XV, recibió 2 plantas de piña, las cultivaron en los invernaderos de Versalles, convirtiéndose Francia en el primer país europeo que lo produce. Con el paso del tiempo la planta fue extendiéndose por toda Europa, dejó de considerarse fruta exótica para convertirse en uno de los manjares más apetecidos durante la temporada de calor.

Los aztecas le daban a la piña propiedades curativas, le adjudicaban la cura de enfermedades como: infecciones intestinales, artritis, hipertensión, anemia, depresiones mentales y cálculos renales entre otros. Se sabe que posee una enzima llamada “Bromelina” que ayuda a desinflamar las coyunturas musculares y contener un alto grado de fibra que es un excelente aliado contra el estreñimiento.

Anteriormente se creía que los indios Tupí-Guaraní de la región, donde actualmente se juntan las fronteras de Brasil, Argentina y Paraguay habían domesticado la piña

(Collins, 1960). Ciertamente, diversas especies de *Ananas* y géneros relacionados se han encontrado ahí, creciendo en forma silvestre (Samson, 1991). Sin embargo, Brucher en 1977, opinó, de que *Ananas sativus*, var. Cayena, se originó cerca de la desembocadura del río Amazonas, en el nor-este de Brasil, cerca de Sao Paulo y Paraguay, aunque no menciona el importante hecho de que un cultivo tan adaptado a la sequía pueda haberse originado en una zona tan húmeda.

Los viajeros pronto llevaron la piña a otras partes del mundo. Esto resultó ser fácil debido a que la corona (y otras partes de la planta) soportan muy bien la desecación. Actualmente, el cultivo crece en cualquier zona de las regiones tropicales y en algunas regiones subtropicales (Samson, 1991).

La piña se cultiva a gran escala en la zona ecuatorial, principalmente a lo largo de las costas orientales (las costas occidentales son frías) o en islas ubicadas dentro de las regiones tropicales (Hawai, Taiwán). Los lugares cercanos al ecuador donde se cultiva la piña son Kenia, a 1500 msnm, y en Filipinas entre los 500 y 800 msnm. El cultivo en tierras bajas húmedas tropicales se practica en Malasia y Tailandia sobre suelos turbosos, la variedad que se cultiva no es “Cayena” sino el “Singapore Spanish”. Pero es Costa de Marfil el único productor importante de “Cayena” en las regiones tropicales húmedas (Samson, 1991).

2.1.2 Importancia económica

En 1900 la piña tuvo un desarrollo industrial en todo el mundo en la producción de enlatados a una escala incesante, requiriendo el aumento de la mano de obra de la población en los trópicos y mejorando significativamente el estándar de vida, haciendo posible que esta fruta adecuadamente conservada llegara a miles de personas que vivían lejos de los países tropicales. Hawai popularizó la producción y enlatado de la piña, de este modo la gente de muchos países en la actualidad puede obtener esta

fruta en lata a precios económicos. Así mismo también se inició el desarrollo de la investigación científica sobre este cultivo (Collins, 1960).

En Hawai, después de haber alcanzado un máximo de desarrollo durante la fase de comercialización, el financiamiento por la investigación disminuyó significativamente debido al nivel suficiente de conocimientos adquiridos para la mayoría de las prácticas culturales. Los problemas específicos no resueltos, tales como la sensibilidad a los nematodos, plagas, el control de la floración y la calidad de la fruta, esperan los resultados de nuevas tecnologías como la ingeniería genética (Rohrbach, 1986).

Las mayores productoras de piña son Hawai, México, Costa Rica, Brasil, Colombia, Honduras, República Dominicana, Malasia, India, Congo, Kenia, China, Taiwán, Vietnam, Australia, Filipinas, Bangladesh, Tailandia, Indonesia, sur África, Zaire y Costa de Marfil (Paull, 1997).

En 1999 Tailandia produjo 2331 millones de toneladas y Filipinas 1495 millones de toneladas. La producción mundial ascendió, en el mismo año, a 13 147 millones de toneladas. Ahora en casi todos los países del mundo se cultiva esta variedad de piña MD2 (Golden). (Samson, 1991).

2.2.- Producción y variedades cultivadas en el Perú

2.2.1.-Producción

La demanda internacional de la piña sigue en crecimiento, gracias a los hábitos alimenticios de los consumidores americanos y europeos que consideran a esta fruta tropical como una de las más finas del mundo, destacando en ella su agradable sabor, aroma y el importante contenido de vitamina C.

La producción total peruana bordeó las 212059 tn, de las cuales el 49% se concentró en la región de Junín (104757 tn). Asimismo, son de gran importancia en la producción

nacional, las regiones de La libertad, Loreto, San Martín, Cuzco, Amazonas con volúmenes de 27567 tn, 20353 tn, 14227 tn, 8075 tn y 7939 tn, respectivamente. La producción de piña se realiza todo el año, en todas las regiones productoras, aunque mostrando incrementos a finales del año (Octubre-Diciembre) de las regiones orientales, a diferencia de las regiones de la costa norte, como Lambayeque y Piura, cuyos incrementos se dan en los primeros meses del año (Enero – Marzo).

El rendimiento promedio nacional es de 14,84 tn /Ha, pero los rendimientos más altos los posee la región La libertad y Piura con 24,866 tn/Ha, y 24,356 tn/Ha respectivamente. Por otro lado, los rendimientos más bajos se obtienen en la región Cajamarca y Amazonas con valores de 9,571 tn/Ha y 9,032 tn/Ha, respectivamente. (Ministerio de Agricultura, al 2007).

El Área de Investigación y Desarrollo de AMPEX, identificó exportaciones peruanas de piña superiores a los US\$ 177 mil dólares valor FOB, por un volumen aproximado a 231,3 mil Kg. de las cuales el 63% correspondió al producto certificado como orgánico. La fecha con mayores ventas fue Mayo del 2009 con un valor FOB superior a los US\$ 48,7 mil dólares y un volumen superior a 53,4 mil Kg. La variación entre los años 2008 - 2009 en el periodo Enero – Diciembre fue positiva en un 187% dado que en el 2008 se exportó un monto cercano a US\$ 61,8 mil dólares, comparado al año 2009 que aumentó a US\$ 177,7 mil dólares valor FOB.

El principal país destino de las exportaciones de Piña en este periodo, ha sido Estados Unidos con el 87% del total de las exportaciones y envíos superiores a US\$ 153,7 mil dólares (230 mil Kg). El segundo principal destino fue Alemania con el 13% del total exportado y un valor FOB en envíos superior a US\$ 23 mil dólares (754 Kg).

Al 2009 se ha podido registrar 11 empresas exportadoras, siendo la principal empresa exportadora Sociedad Agrícola Saturno S.A. con una participación del 82%, con envíos superiores a US\$ 146,2 mil dólares valor FOB y un volumen de 229,8 mil Kg

seguida de la empresa Liofilizadora del Pacífico S.R.L. con un valor FOB superior a US\$ 30,5 mil dólares y un volumen de 981 Kg.

Los precios pagados por la caja de piña variedad Golden son mucho mayores a la de otras variedades de piña, siendo el mercado europeo el más atractivo para los exportadores de este producto. Suiza es el mejor mercado ya que últimos reportes indican precios de hasta US\$ 16,09, seguido por Dinamarca con US\$ 15,70 y Suecia con US\$ 14,00, todos ellos por cajas de 6 unidades en la variedad Golden.

2.2.2.- Zonas de producción mundial

La producción de *Ananas* tuvo sus inicios en Hawái que presenta más de la mitad de la producción mundial de piña. Sin embargo, a principios de la década de 1960, su producción actual aumentó, ocupa el quinto lugar: Existe un rápido aumento en la producción de la mayoría de los países productores, especialmente en Tailandia y Filipinas. Sin embargo, es posible juzgar sólo por las estadísticas (Samson, 1991).

Como lo señalan Py y Tisseu en 1965, sólo las cifras de exportación se conocen con exactitud. Es difícil, sino imposible establecer cuándo se consume localmente, qué proporción se exporta como fruta fresco, etc. Además, un importante productor (Taiwán) ya no aparece en las estadísticas de la F. A. O. Naville (1976) indicó que su producción fue de 358 000 toneladas en 1971 y 294 000 toneladas en 1972.

De acuerdo con Akamine (1972) la disminución de la producción de piña en Hawái fue una consecuencia de la desocupación de las tierras para dedicarlas al negocio de los bienes raíces, mucho más lucrativo. Naville (1976) también informa de una disminución: el enlatado bajó de 361 000 toneladas en 1972 y 284 000 en 1975; atribuye lo anterior a la inversión realizada por dos compañías de los Estados Unidos en Taiwán, Filipinas y Tailandia, donde la mano de obra es más barata. También proporciona un ejemplo de la influencia de los precios en el mercado: cuando en

México se empezaron a pagar 80 dólares/t de fruta en fresco y solamente 48 dólares por tonelada de fruta para enlatada, se presentó una caída en la elaboración.

Estimando que el 28 % de la producción mundial de piña en 1972 se destinó a las enlatadas y 5 % se exportó como fruta en fresco. Últimamente, las exportaciones de fruta en fresco aumentan muy rápido, por ejemplo las importaciones a la Comunidad Económica Europea aumentaron de 1970 y 1975 de la siguiente manera(x 1000 toneladas): rebana 121 - 171, fruta en fresco de 30 - 70 y jugo de 20 - 28. La mayor parte de las piñas exportadas a la CEE, proviene de Costa de Marfil. También Malaysia y Kenia se han convertido en importantes exportaciones.

2.2.3.- Zonas productoras y variedades cultivadas en Perú

El área de cultivo en Perú según el Ministerio de Agricultura (1989) fue de 2 195 Ha, de las cuales aproximadamente 580 están bajo riego y 16 115 bajo secano, entre los cuales Loreto y Junín constituye los departamentos de mayor área bajo la modalidad de secano con 630 y 485 Ha respectivamente. Asimismo, en la costa norte, en la Libertad, reporta 440 Ha con la modalidad de riego.

En el Perú, la piña ocupa el 10° lugar en importancia económica entre los frutales cultivados. A nivel nacional existen 14,289 has sembradas con una producción de 14,840.7 kg/ ha (FAO, 2008). La mayor {área cultivada está en la selva, principalmente Loreto, Pucallpa, Junín (Valle de Chanchamayo y Satipo), San Martín, Cuzco, Huánuco y Amazonas. En la costa las plantaciones de piña se encuentra mayormente en la zona norte: La Libertad, Piura, Lambayeque y Tumbes. La variedad trujillana se utiliza mayormente para la fabricación de conservas y las piñas de la selva (Chanchamayo, Bagua, Satipo y Pucallpa) se destinan casi íntegramente su producción al consumo en estado fresco con excepción de Chanchamayo, donde existe una planta para el procesamiento de enlatados (Bello, 1991).

2.2.4.- Principales variedades en el Perú

En la selva central, se cultiva las variedades comerciales: Cayena Lisa, Golden, Hawaiana, Samba Chanchamayo y Lagarto; todas destinadas para el mercado regional y nacional.

- **Cambray (Milagreña):** Es la variedad Perolera, originaria del Brasil y hasta hace poco la más cultivada, su fruto se destina exclusivamente al consumo local como fruta fresca, de tamaño grande, tiene forma cónica y ojos profundos, corazón grueso. Pulpa blanca, es poco adecuada para la industrialización.

- **Cayena Lisa:** Esta variedad es posiblemente originaria de Guayana, con un área de cultivo en permanente expansión dada sus posibilidades para la industrialización y la exportación como fruta fresca, de tamaño medio, la fruta tiene forma cilíndrica, ojos superficiales, corazón delgado y pulpa amarilla.

- **Champaka F-153:** Es un clon puro de la variedad Cayena Lisa, es más resistente a enfermedades que las otras variedades, es una variedad con gran aceptación y alta demanda en los mercados de exportación.

- **MD2:** Es una variedad de reciente introducción al país que por su presentación, aroma, etc. Está catalogada como una fruta de lujo en los mercados externos.

2.2.5.- Algunas variedades cultivadas en el Mundo y Perú

Según Figueroa (1970) la mayoría de las variedades mejor conocidas en el mundo pertenecen a uno de los tres grupos que ya existían en 1493. Estos grupos son : “Española” , “Queen” y “Cayena”. Los tipos criollos que mayormente se cultivan en el Perú y otros países de Sur América aún no han sido cuidadosamente estudiados y la relación de éstos con los tres grupos mencionados no ésta claramente definida.

A.- Grupo “Española” es un grupo cuyas plantas presentan hojas erectas, con frutos que tienen una pulpa consiste de color blanco. La variedad “Española Roja” que

corresponde a este grupo se caracteriza por su crecimiento muy vigoroso. Tiene una producción abundante de hijuelos en la base del fruto pero produce escaso número de ellos en la base del tallo. Los frutos nacen de un pedúnculo de 20 – 25 cm de longitud y alcanza un peso entre 1 y 2 kg con un grosor mayor en la parte media que en la base. La superficie del fruto a la maduración es rojo-amarillenta, resiste bien el transporte, pero la calidad de la fruta no es muy buena. Una variedad denominada “Española de Singapur” presenta hojas bordes lisos y es la piña que más se cultiva para enlatado en Malasia.

B.- Grupo “Queen”, es un grupo que se caracteriza por presentar hojas de longitud relativamente corta, angosta y de posición vertical, dándole a la planta una apariencia compacta. Los frutos de esta raza tienen la pulpa de color amarillo acentuado. Este grupo fue el primero en cultivarse bajo condiciones de invernadero en Europa en el siglo XVII, 2 selecciones de este grupo son ahora importantes: “Natal Queen” en Sudáfrica y “McGregor Queen” en Australia, con una producción abundante de hijuelos en la base del tallo, pero sólo unos pocos hijuelos en la base del fruto.

C.- Grupo de “Cayena Lisa” es un grupo cuyas plantas se caracterizan por su notable vigor y por tener hojas largas, excepcionalmente anchas y de bordes lisos.

“La Cayena Lisa” es la variedad típica, que fue llevada de Cayena (Guayana Francesa) al Jardín Botánico de París en 1820, lugar del cual 21 años después fue enviada a Kew Gardens, cerca de Londres; en 1851 a Queensland, Australia y por último enviada en 1890 a Hawai.

La variedad Cayena Lisa, introducida de Puerto Rico en 1980, logró en nuestro País una buena adaptación a las condiciones del valle de Moche (Trujillo) y en la selva, en Tingo María y en Chanchamayo. Tiene excelentes características de fruto para el consumo en fresco y la industria.

En Perú, las plantaciones comerciales de piña comprende cierto número de tipos varietales o cultivares introducidos en fechas no precisas y que ahora se les conoce con nuestro medio, en varias localidades, de diferentes condiciones de clima y suelo, presentan características muy similares, lo que hace suponer que proceden originalmente de un mismo material genético (Figuerola, 1970).

En general estos cultivos, de acuerdo al aspecto de la planta y del fruto, se pueden clasificar en dos varietales: Las piñas blancas y las piñas rojas. Las consistencia tiene bastante vigorosas, frutos con la parte comestible o pulpa de consistencia suave y de buen sabor; a este grupo pertenecen la “Ecuatoriana espinosa”, la “Blanca de Chanchamayo” y la “Miel de abeja de Pucallpa”. En cambio las piñas rojas presentan una pulpa de consistencia más áspera (fibrosa) y de calidad algo inferior (alta acidez) a las piñas blancas, especialmente en zonas de clima caluroso. Dentro de este grupo se puede mencionar a la “Roja Trujillana” y la “Samba de Chanchamayo”. Términos generales se consideran las piñas rojas, como la más resistente al transporte.

La variedad “Samba de Chanchamayo” es una piña que se caracteriza por su rusticidad y está mejor adaptada a las condiciones climáticas y edáficas de Chanchamayo. Estas presentan mayor vigorosidad, abundante formación de hijuelos en la base del fruto y pocos hijuelos en la base del tallo. Las hojas de bordes lisos o bordes enteros, espinosos, erectas largas y de ancho moderado. La superficie del fruto es rojo oscuro a la madurez; algo cilíndrico y con un peso promedio entre 1,2 – 1,9 kg. La parte comestible del fruto es de color blanco amarillento. La relación entre el contenido de acidez y azúcares le confiere un sabor satisfactorio. El fruto resiste bastante bien el transporte (Figuerola, 1970).

La variedad Cayena Lisa no presenta espinas, eso permite tener mayor número de plantas por hectáreas, facilitando los trabajos y sus frutos son grandes y cilíndricos.

La cayena es de color naranja amarillento oscuro y posee una pulpa amarilla claro con una bonita tonalidad dorada. Su pulpa es más consistente, tiene más firmeza, por lo tanto la duración del fruto es mayor y es apto para la industria. La desventaja que tiene la Cayena Lisa es que emite pocos brotes, es decir pocas mudas por la planta.

La variedad MD2 “Golden” es de reciente introducción al país que por su presentación, aroma, etc. Está catalogada como una fruta de lujo en los mercados externos. Es una piña tropical de buen tamaño de color atractivo y dorado en la cáscara, pulpa de color amarillo intenso, procede de Costa Rica y posee unas cualidades gustativas excelentes, muy dulce y cada vez más apreciada en el mercado internacional.

2.3.- Ubicación taxonómica

Según Cronquist (1981):

Clase: Liliopsida

Subclase: Liliopsidae

Orden: Poales

Familia: Bromeliaceae

Género: *Ananas*

Especie: *Ananas comosus* (L.) Merr

La familia Bromeliaceae presenta 50 géneros y 2000 especies distribuidas en hábitats diferentes para el género *Ananas* según Smith (1979). La variedad *Ananas comosus* (L.) Merr. Comprende diferentes especies: *Ananas monstrosus*, *A. ananasoides*, *A. ananas*, *A. paraguayensis*, *A. lucidus*, *A. bracteatus*, *A. fritzmuelleri* y *A. comosus*. De las mencionadas solamente *A. comosus*, es la única especie comestible y comercial. (Py y Guyot, 1970).

2.3.1.- Morfología

Es una planta herbácea, perenne, auto estéril, generalmente se realiza propagación vegetativa, aunque existen técnicas por reproducción sexual. Las características principales de la planta productora de piña (*Ananas comosus*) son: altura promedio de 1 a 2 metros en su etapa adulta, ancho de 1 - 2 m en etapa adulta. Presenta carga genética de $2n = 50$.

En suelos fértiles y de buena aireación, las raíces son numerosas, gruesas, turgentes y densamente cubiertas por pelos absorbentes (Figueroa, 1970) las cuales se distribuyen en forma superficial en los primeros 20 – 30 cm de profundidad. Sin embargo, algunas veces puede llegar a alcanzar profundidades mucho mayores dependiendo de la variedad. El sistema radicular tiene una extensión de 1 – 2 m lateralmente y 0,85 m en profundidad. El número de raíces producidas tiene una correlación positiva con el peso del vástago (Bartholomew *et al.*, 2003). En suelos infértiles de pobre aireación, las raíces son escasas, delgadas y con pocos pelos absorbentes. En estas plantas, las raíces rara vez se extienden más de 30cm de la base del tallo ni alcanza más de 15 cm de profundidad (Figueroa, 1970).

Las raíces son de dos tipos: subterráneas y aéreas (adventicias), estas últimas se desarrollan a partir de las axilas de las ultimas hojas: Cuando las hojas viejas se deterioran se pueden observar la formación de raíces que penetran el suelo, las raíces que se desarrollan en la parte basal se enrollan alrededor del tallo y juegan un rol importante en la absorción de nutrientes. El sistema radicular en su conjunto es muy superficial, depende básicamente de las condiciones físicas del suelo (Py & Guyot, 1970).

El tallo es corto de consistencia herbácea, relativamente grueso y con entre nudos muy gruesos, de diámetro basal de 2 – 5 cm y de 5 – 8 cm en la parte más ancha del

ápice. Presenta 32,6 – 40 cm. de alto, el cual se prolonga en su parte superior hasta formar el eje principal de la inflorescencia, donde más adelante se formará el fruto (Bartolomew et al., 2003). Los entrenudos son muy cortos, de 1 - 10 mm. (Py & Guyot, 1970). El tallo original puede dar lugar sólo a un fruto, pero hijuelos basales pueden a su vez desarrollar nuevos frutos en años subsiguientes, del mismo modo que el tallo original.

El primer año de crecimiento de la planta, es un proceso continuado formándose las nuevas hojas a la altura meristemática apical del tallo. Después de un año de crecimiento, se inicia la pigmentación rojiza en las hojas de los últimos verticilos. Las hojas son largas y delgadas en forma de lanza cuya longitud va desde los 30 hasta 100 cm y un diámetro de 1 cm. el número de hojas por planta oscila entre 50 – 70 con una filotaxia de 5/13. Las tonalidades pueden ser verde claro o verde rojizo, según la variedad. Son arrosetadas, lineales, lanceoladas, acanaladas, tiesas, ápice agudo con borde entero o liso, base envolvente al tallo. Presentan modificaciones especiales como son los tejidos acuíferos que constituye el almacén de agua de la planta y los tricomas que son excreciones de célula. Esta disposición de la hoja permite en su base retener el agua de la lluvia o rocío que cae sobre la planta. Las hojas poseen inadaptación a la pérdida de agua de sus tejidos, tolerando satisfactoriamente los periodos de sequía (Figueroa, 1970).

La más importante es la denominada hoja D que es la más joven, que ha terminado su crecimiento, a esta hoja se le puede reconocer por ser la más larga y por estar insertada en la parte más ancha del tallo, formar un ángulo de 45° con el eje vertical o por tener una base recta formando un ángulo de 90°; es la que refleja el estado fisiológico de la planta durante el periodo de crecimiento y es útil para estimar las necesidades nutricionales de la planta para su normal crecimiento y está relacionado con el peso total de la planta y el fruto (Figueroa, 1970).

El ápice de la hoja es siempre de punta aguda y los márgenes pueden presentar espinas o aparecer con una superficie lisa. Desde que esto es una mutante, plantas con borde entero o liso parecen mutar hacia formas espinosas originales (Figueroa, 1970). La forma de la hoja varía y depende de la posición en el tallo y la edad, es importante para el agricultor como el investigador, conocer las diferentes formas de las hojas. Hay diferentes formas: Hojas exteriores, ya completamente desarrolladas cuando el brote (hijuelos, esquejes, corona) se planteó; presentan un “cuello” o una zona de crecimiento restringido, cerca de la base y tienen prácticamente una posición horizontal.

La inflorescencia presenta en forma de espiral o roseta compuesta por 100 ó 200 flores individuales dispuesta alrededor de un tallo o eje central. Cada flor dará origen a un fruto pequeño. Las flores son de color rosa y tres pétalos que crecen en las axilas de unas brácteas apuntadas, de ovario hipógino. Son numerosas y se agrupan en inflorescencias en espiga de unos 30 cm. de longitud y de tallo engrosado. Las flores dan fruto sin necesidad de fecundación, en el ovario hipógino se desarrollan unos frutos en forma de baya, que conjuntamente con el eje de la inflorescencia y las brácteas, dan lugar a una infrutescencia carnosa (sincarpico).

El fruto tiene forma cilíndrica, globosa o piramidal. Su peso va desde uno hasta cuatro kilos (2,2 – 8,8 lbs), mide en promedio unos 30 cm. de altura, con un diámetro de 15 cm, con peso alrededor de los 2 Kg. El color de su pulpa es amarillo o blanco. La piña es una monocotiledónea herbácea, que madura su fruto a los 18 ó 22 meses después de plantada. Cada planta produce una sola fruta compuesta sobre su vástago central. Cerca de un año después la planta producirá retoños axilares.

2.3.2.- Reproducción

La reproducción de la piña se hace en forma vegetativa utilizando a veces la corona del fruto, o bien los vástagos o hijos de plantas sanas y productivas, materiales que deben seleccionarse por tamaños para asegurar la uniformidad en las plantaciones (Py, 1969).

2.4.- Técnicas de propagación.

2.4.1.- Propagación convencional

Es uno de los métodos tradicionales en el cual los retoños, hijos o vástagos emergen del tallo de la planta y son los que usualmente se usan para la instalación de nuevas plantaciones. Según (Figuerola *et al* 1970), sostienen que estos sirven de material de propagación, descritos como:

- Hijuelos de corona, conformada por las brácteas foliares del ápice de la inflorescencia y crece simultáneamente con el desarrollo del fruto, entrando en un estado de aparente inactividad a la maduración.
- Hijuelos de los pedúnculos, (bulbillos), se desarrollan en las axilas de las brácteas del pedúnculo.
- Hijuelos del tallo, que se encuentran en la zona de transición entre el tallo y el pedúnculo.
- Hijuelos con raíces, que se desarrollan en la base de la planta.

2.4.2.- Propagación por cultivo de tejidos

El desarrollo de la técnicas de cultivo demuestra que es ventajosa por la rapidez en la propagación de la planta, consiste en aislar una porción de la planta (explante) bajo condiciones asépticas, sea esta una célula, un tejido o un órgano, y proporcionarle

artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido.

La micropropagación *in vitro* es una técnica más elaborada, pues requiere de laboratorios especializados para su realización. Sin embargo, este método puede ser usado no solo para la producción de mudas sanas y de buena calidad, sino también, cuando existe escasez de material para la plantación (Cunha *et al.*, 1999 citado por Cechetti M *et al* 2002). Se usará la siguiente técnica:

2.4.3.- Sistema de Inmersión Temporal

Es un sistema que está constituido por dos frascos, de los cuales, uno se utiliza para colocar el inóculo y en el otro frasco, el medio de cultivo. Ambos frascos poseen dos vías de acceso: la primera es para la ventilación y la segunda para el intercambio de medio de cultivo entre ambos frascos. En cada frasco, la circulación del aire es esterilizada mediante filtros hidrofóbicos. (Escalona *et al.* 1999).

El biorreactor es ampliamente usado en el cultivo de varios microorganismos como células microviales, animales y vegetales con el fin de producir distintos metabolitos o células (Takayama & Akita, 2000). El uso del biorreactor en la propagación de plantas es ventajoso para incrementar la eficiencia de producción de brotes debido a que resuelve muchos de los problemas que encontramos en las técnicas de cultivo de tejidos convencional, en las que se usan medios semisólidos y sólidos como son:

- Necesidad de gran cantidad de frascos.
- Mayor cantidad de mano de obra.
- Gran cantidad de herramientas e instrumentos de laboratorio.
- Necesidad de gran cantidad de espacio.

Los méritos de uso de biorreactores en propagación de plantas son los siguientes (Takayama & Akita, 1994):

- Es fácil producir un gran número de explantes.
- El manipuleo de los cultivos como la siembra y cosecha es sencillo, lo cual ahorra tiempo y recursos.
- Los cultivos están siempre en contacto con el medio y esta es la causa de estimulación en la toma de nutrientes lo cual resulta en la estimulación de la tasa de crecimiento.
- Aireación forzada (abastecimiento de oxígeno) estimula la tasa de crecimiento y alcanzar el incremento de la biomasa.
- Desaparición de la dominancia apical, debido a que los cultivos se mantienen en movimiento, propiciando el crecimiento de numerosos brotes hasta la formación de explantes.

III OBJETIVOS

3.1.- Objetivo general:

- Determinar los factores que influyen en la propagación *in vitro* de la “piña” variedad MD2 en un Sistema de Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT).

3.2.- Objetivos específicos:

- Establecer el protocolo de introducción a cultivo *in vitro* de yemas de la corona de piña.
- Cuantificar la tasa de multiplicación por explante mediante reguladores de crecimiento, auxinas y citoquininas bajo el Sistema BIT.
- Determinar el número adecuado de subcultivos en la planta que presentan variaciones somaclonales tanto en el Sistema BIT y en frascos de propagación.

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.- Material Biológico:

Plantas *in vitro* de Piña (*Ananas comosus* L.) Merr cv. MD2 mantenidas en el laboratorio del Instituto de Biotecnología – UNALM (procedente de Chanchamayo) y plántulas obtenidas a partir de meristemos. Todas estas accesiones se encontraban originalmente en el medio de mantenimiento y micropropagación *in vitro* a 18 °C y 16 horas de luz de fotoperiodo.

4.2.- Métodos

El procedimiento utilizado para la introducción de las yemas de la corona se encuentra ilustrado en el anexo 2. Se propagaron plántulas *in vitro* adquiridas del laboratorio del IBT para aumentar el material de investigación, esto se realizó bajo el método de Sistema Automatizado de Inmersión Temporal (Biorreactores).

4.3.- Materiales de laboratorio

4.3.1.- Reactivos:

- Sales Murashigue Skoog
- Vitaminas MS
- Vitaminas Morel
- Hormonas vegetales: Bencil amina purina (BAP), KIN, ANA, IBA
- Agua destilada
- Lejía clorox de NaOCl 4.9% equivalente a 50g/l

4.3.2.- Materiales de vidrio, plástico y otros:

- Biorreactores de plástico
- Filtros
- Mangueras de silicona de 10 mm de diámetro y 1.5 mm de grosor.
- Frascos de vidrio de 250 ml y 400 ml de capacidad
- Tubos de ensayo
- Probetas graduadas de 100, 1000 y 2000 ml
- Pipetas graduadas de 1.5 y 10 ml
- Tijeras, pinzas, bisturíes

4.3.3.- Equipos:

- Cámara de flujo laminar Marca Cabina FLOW 100 H
- Sistema Automatizado No registra marca.
- Autoclave Marca Pemalor
- Balanza analítica Marca OHAUS o SARTORIUS
- Agitador magnético Marca CAT M6/1
- Destilador de agua 4l /h
- Horno esterilizador Marca MEMMERT
- Fuentes de poder de 600 y 3600 voltios
- Equipo temporizador para ventilación y fotoperiodo controlado

4.3.4.- Medio de cultivo

Los macronutrientes y micronutrientes se usaron a concentraciones según Murashige y Skoog, esto como medio base para los tratamientos establecidos. La marca de los reactivos usados fueron JT Baker, LABCHEM, MABELSA, Merck y Sigma. Todos los reactivos usados se pesaron por separado y se disolvieron por separado.

Cuadro Nº 1: Cantidad de macro y micronutrientes usados en la preparación del stock general

	1 L
MACRONUTRIENTES	mg/L
1.- NH ₄ NO ₃	0,1650
2.- KNO ₃	0,1900
3.- CaCl ₂ .2H ₂ O	0,440
CaCl ₂ .6H ₂ O	0,655
4.- MgSO ₄ .7H ₂ O	0,370
5.- KH ₂ PO ₄	0,170
	1 L
MICRONUTRIENTES	mg/L
1.- MnSO ₄ .4H ₂ O	15,6
MnSO ₄ .H ₂ O	8,45
2.- ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
3.- H ₃ BO ₃	6,2
4.- KI	0,83
5.- NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,25
6.- CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
7.- CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
8.- FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
9.- Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3

Se preparó un stock de 50 L para ser utilizado de forma gradual en las tres fases que presenta la investigación. Los macronutrientes se pesaron por separado porque cada una de ellas reaccionan diferente, luego de disolverlo en 100 ml ó 500 ml según lo requiera cada reactivo, se llevó todo a una probeta de 2000 ml. En caso de los micronutrientes se sigue los mismos pasos que los macronutrientes en la preparación con la diferencia de disolverlo cada reactivo en solo 100 ml y llevarlo todo a una probeta de 1000 ml. Dentro de los micronutrientes se encuentra el $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ estos dos se pesan y se disolvieron por separado pero no va junto con los micronutrientes se coloca en otra frasco de 500 ml cubierto de papel aluminio.

Cuadro Nº 2: Composición de vitaminas utilizadas para la preparación del stock.

Vitaminas MS	mg/ L	Vitaminas Morel	mg/ L
Myo-inositol	100	Pantolato de Ca	0,125
Tiamina - HCl	0,1	Tiamina - HCl	0,125
Glicina	2	Glicina	3,75
Acido nicotínico	0,5	Acido nicotínico	0,625
Pyridoxina - HCl	0,5	Pyridoxina - HCl	0,125

Se utilizaron dos tipos de vitaminas MS y Morel. Las vitaminas MS se pesaron y se disolvieron por separado cada vitamina fué disuelta en 100 ml. Al igual que las sales se optó por preparar un stock de 50 L. Para las vitaminas Morel se siguió los mismos

pasos con la diferencia que se preparó un stock de 10L, porque sólo se utilizó para un tipo de medio (2: 1.8: 2).

Cuadro Nº 3: Solución Stock usada en la preparación del medio base

Solución stock de las sales y vitaminas MS 50L		
Macronutrientes	40 ml / L	
Micronutrientes	20 ml / L	
Fe + EDTA	10 ml / L	
Vitaminas MS	Tianima	1 ml / L
	Ac. Nicotínico	2 ml / L
	Piridoxina	2 ml / L
	Glicina	2 ml / L
	Myo-inositol	10 ml / L
Stock de vitaminas Morel	10 L	10 ml / L

Estos stocks permitieron abastecer todas las fases de la investigación y así cumplir con el cronograma establecido e instalar todas los experimentos.

Cuadro N° 4: Tratamientos y medios de cultivo para frascos y biorreactores

Valores dados en mg L ⁻¹				
Citoquininas	BAP	0	2.1	0
	KIN	0	0	2
Auxinas	ANA	0	0.3	0
	ANA - IBA	0	0	1.8 : 2
Suplementos		Myo-inositol 100+Vitaminas MS + 20g de sacarosa	Myo-inositol 100+Vitaminas MS + 20g de sacarosa	Myo-inositol 100+Vitaminas Morel +Ácido fólico10 mg/lit + 20g de sacarosa
Tratamientos		1	2	3
Abrev. de los tratamientos		0 : 0	2.1 : 0.3	2 : 1.8 : 2

Todos los tratamientos se ajustaron a un **pH: 5,7**

Los medios de cultivo establecidos se obtuvieron del laboratorio (IBT) para ser experimentados y tener un referente con datos reales de su efectividad.

4.4.- Procedimiento

4.4.1.- Primer etapa: Introducción de yemas de la corona de piña.

En la primera etapa se realizará la introducción de meristemas que se obtuvieron a partir de las yemas de la corona de la infrutescencia madura de la piña. Se cortó la corona a manera de deshojarla con una tijera con mucho cuidado sin arrancarla ya que, las yemas se encuentran en la parte inferior de la corona. Luego se remojó con detergente por 10 minutos, y se enjuago 3 veces.

En una probeta de 100 ml se agregó 50 ml de lejía y lo demás se completó con agua destilada, considerando a esta solución lejía al 50%. Del mismo modo se preparó 100ml de lejía al 25% y 10%.

Dentro de la cámara de flujo laminar se realizó la desinfección de la corona de la piña, la cual se llevó a cabo mediante la aplicación de 5 pasos:

Primero. Se colocó la corona de piña a una concentración de lejía del 50 % por 20 min. Se enjuagó 3 veces con agua destilada; luego se pasó a alcohol de 70° para la primera desinfección, lo mismo al usar lejía al 10 % para la segunda desinfección por 10 minutos. Se enjuagó 3 veces con agua destilada y se sembró en los tubos.

Segundo. Se colocó la corona de piña a una concentración de lejía al 50 % por 10 min. Se enjuagó 3 veces con agua destilada; luego se pasó con alcohol de 70° para la primera desinfección, lo mismo al usar lejía al 10 % para la segunda desinfección por 5 minutos. Se enjuagó 3 veces con agua destilada y se sembró en los tubos.

Tercero. Se colocó la corona de piña en una solución de fungicida comercial de Fartmathe y Captan en la primera desinfección por 1 hora, y la segunda desinfección con lejía al 10% por 10 min. Se enjuagó 3 veces con agua destilada y se sembró en los tubos.

Cuarto. Se colocó la corona de piña a una concentración de lejía al 50 % por 15 minutos. Se enjuagó 3 veces con agua destilada; luego se pasó con alcohol de 70° para la primera desinfección, lo mismo al usar lejía al 10 % para la segunda desinfección por 7 minutos. Se enjuagó 3 veces con agua destilada y se sembró en los tubos.

Quinto. Se colocó la corona de piña a una concentración de lejía al 25 % por 15 minutos. Se enjuagó 3 veces con agua destilada; luego se pasó con alcohol de 70° para la primera desinfección, lo mismo al usar lejía al 10 % para la segunda

desinfección por 10 minutos. Se enjuagó 3 veces con agua destilada y se sembró en los tubos.

Cuadro N° 5: Resumen de los tratamientos de desinfección. Las coronas fueron desinfectadas después de retirar las hojas (D1). Las yemas retiradas de la corona fueron desinfectadas posteriormente (D2)

Valores dados en % / min					
Lejía %	D1: 50 D2: 10	D1: 50 D2: 10	D1: Fartmathe y Captan D2: 10	D1: 50 D2: 10	D1:25 D2:10
Tiempo (min) (T)	T1: 20 T2: 10	T1: 10 T2: 5	T1: 60 T2: 10	T1: 5 T2: 7	T1: 15 T2: 10
Tratamiento	1	2	3	4	5
Abrev. de los tratamientos	50-10 / 20-10	50-10 / 10-5	Fart-Cap / 60-10	50-10 / 15-7	25-10 / 15-10

Preliminarmente se determinó que el tratamiento de desinfección con mejor resultado fue: (25: 10 / 15: 10). Los pasos que se siguió para la introducción de las yemas se pueden observar en el anexo N° 2.

Desinfección 1:

Se colocó en hipoclorito de sodio al 25% por tiempo de 15 minutos, luego se realizó tres enjuagues con agua destilada autoclavada, se pasó por alcohol de 96% por un tiempo de 30 segundos y se realizó un enjuague con agua destilada autoclavada.

En seguida se realizó la extracción de las yemas en forma de triángulos, las cuales pasarán a una segunda desinfección.

Desinfección 2:

Se colocó en hipoclorito de sodio al 10% por un tiempo de 10 minutos, luego se realizó tres enjuagues con agua destilada autoclavada. Se dejó en agua destilada autoclavada para su introducción.

Se realizó la introducción usando el medio (2.1:0.3), en líquido .

Las yemas se colocaron sobre el papel filtro, que es el soporte ya que las yemas necesitan estar oxigenadas y no sumergidas totalmente en el medio, fueron incubadas por 3 - 4 meses aproximadamente y luego transferidas a los frascos hasta el tercer sub-cultivo.

4.4.2.- Segunda etapa: Multiplicación del material obtenido en frascos

Para la fase de multiplicación de material las plántulas fueron subcultivadas por 3 ó 4 veces en frascos de vidrio con un medio de cultivo semisólido (2:1.8:2).

También se utilizará el material de frascos con plantas ya proliferadas anteriormente, con más de 7 sub-cultivos.

Bajo condiciones de esterilidad se micropropagaron plántulas que se encontraban en el medio de mantenimiento, se sembraron las plántulas obtenidas en los tubos, crecieron hasta un tamaño considerable para luego realizar cortes longitudinales a las plántulas para lograr una rápida proliferación. Se marcaron como clon 1 hasta el clon 4, y se empezó la multiplicación hasta llegar al tercer subcultivo.

Se trabajó con 3 tratamientos o medios de cultivo según el cuadro N° 4 de medios de cultivo.

4.4.3.- Tercera etapa: Multiplicación del material en biorreactores

Descripción de un sistema semi automatizado de Inmersión Temporal

Es un sistema cerrado consta de dos frascos de plástico de (44 cm de diámetro y 26 cm de altura), uno de los frascos fue utilizado para colocar el explante brotes de plántulas *in vitro* de piña (del tercer o cuarto sub-cultivo) de la variedad MD2 y en el otro frasco estuvo el medio de cultivo; las tapas tenían dos vías de acceso, una para la ventilación con su respectivo filtro y otra para el intercambio de medio de cultivo entre ambos frascos, se usaron mangueras de silicona (10 mm de diámetro y 1.5 mm de grosor).

En cada frasco la circulación del aire fue esterilizada por filtros hidrofóbicos (0,2 μm , ACRO R, Pall Corporation). Mediante electrovalvulas se reguló la ventilación, las cuales fueron controladas por medio de un temporizador (MICRO PC- MOLLER R), que al mismo tiempo controló el fotoperiodo (Escalona et al., 1999).

Funcionamiento del Sistema de Inmersión temporal

El sistema biorreactor consiste en 2 contenedores uno para el crecimiento de la planta y un reservorio para el medio líquido, los 2 contenedores son conectados por tubos de siliconas y vidrio. Dentro de cada contenedor, el flujo del aire es estéril por que pasa por los filtros hidrofóbicos de 0,2 μm .

La presión del aire desde un compresor de aire empuja el medio desde un contenedor al otro hasta sumergir a la planta completamente. El flujo de aire es reversible hasta retirar el medio desde el contenedor de cultivo, el tiempo es controlado electronicamente la frecuencia y duración de el período de inmersión, esto se realizará

en intervalos de tres horas. El temporizador electrónico controlará las electrovalvulas que permiten la ejecución. (Escalona et al., 1999).

Esterilización de medios de cultivo y el Sistema de Inmersión Temporal

Se preparó el medio según el tratamiento y se colocaron 1 L en los contenedores, una vez armado el sistema completo fueron autoclavados a 121 °C con una presión de 15 psi ó 1 atm por un periodo de tiempo de 20 minutos, se recomienda realizarlo de esta forma para evitar cualquier agente contaminante.

Siembra de explantes de piña en el Sistema de Inmersión Temporal

Se realizó bajo condiciones asépticas dentro de la cámara de flujo laminar. se colocó 30 explantes de la variedad MD2 en el frasco vacío, procedentes de la micropropagación realizada anteriormente, luego se selló para evitar que se contamine el cultivo (Escalona et al., 1999). Las variables a evaluar son el inicio de diferenciación y el inicio de la proliferación. Se trabajó con 3 tratamientos o medios de cultivo según el cuadro N° 4.

4.5.- Métodos estadísticos utilizados para el análisis de datos

- Para los experimentos de tubos y frascos se aplicó el diseño completamente al azar (DCA)

Modelo aditivo lineal

$$Y_{ij} = \mu + t_i + \epsilon_{ij}$$

I = Tratamiento 1, Tratamiento 2, Tratamiento 3

Y_{ij} = observación del i-ésimo tratamiento en la j-ésima repetición

μ = media general

t_i = efecto del i-ésimo tratamiento

ϵ_{ij} = desviación al azar de la j-ésima repetición del i-ésimo tratamiento (error experimental)

- Para los experimentos en biorreactores se utilizó el diseño de bloques al azar:

El modelo aditivo lineal.

$Y_{ijk} = \mu + t_i + \beta_j + \delta_{ij} + \epsilon_{ijk}$ $i = \text{Tratamiento 1, Tratamiento 2, Tratamiento 3}$

Y_{ijk} = observación del i-ésimo tratamiento en la j-ésima repetición o bloque y k-ésima muestra

μ = media general

t_i = efecto del i-ésimo tratamiento

β_j = efecto del j-ésimo bloque

δ_{ij} = desviación al azar de la j-ésima repetición del i-ésimo tratamiento (error experimental)

ϵ_{ijk} = efecto aleatorio del error de muestreo

V. RESULTADOS

5.1.- Primera Etapa: Introducción de yemas de la corona de piña.

Los resultados preliminares obtenidos luego de la aplicación de los cinco tratamientos de desinfección, permitió determinar el mejor protocolo que permita obtener el mayor número de yemas en óptimas condiciones. Se obtuvieron diferencias significativas en relación al tipo de tratamiento (cuadro N° 1). Se puede notar que el tratamiento 5 (D1:25 D2:10 con T1:15 T2:10), permitió la formación de un mayor número de yemas diferenciadas con respecto a los demás tratamientos, esto también se puede observar en el anexo N° 4. Al realizar la prueba de separación de medias por Tukey se tiene que el tratamiento 5 es estadísticamente diferente con respecto a los demás tratamientos, siendo el mejor tratamiento ya que presenta un promedio mayor en el número de yemas diferenciadas con respecto a los demás tratamientos. Cabe mencionar que el tratamiento 2 brindó el menor número de yemas adecuadas, ya que la mayoría de los explantes se contaminaron (cuadro N° 6).

Cuadro N°6: Comparación de medias entre los cinco tratamientos según el número de yemas diferenciadas

Tratamiento	Promedio	Tukey Agrupamiento
5	2,94	a
3	1,82	b
1	1,07	b c
4	0,85	c
2	0,60	c

Las letras a, b y c indican grupos de tratamientos estadísticamente diferentes, según la

prueba Tukey, usando un $\alpha=0.05$.

Cuadro N°7: Comparación de medias entre los cinco tratamiento según el número de yemas no diferenciadas

Tratamiento	Promedio	Tukey Agrupamiento
1	5,228	a
4	4,545	a b
5	3,916	c b
3	3,589	c
2	1,345	d

Las letras a, b, c y d indican grupos de tratamientos estadísticamente diferentes, según

la prueba de Tukey, usando un $\alpha=0.05$.

En cuanto a la comparación de los promedios de Tukey se tiene que el tratamiento 1 es estadísticamente diferente con respecto a los tratamientos 2 y 3, nos da un mayor número de yemas no diferenciadas, esto debido a que el tejido meristemático ha sido dañado por demasiada concentración de lejía. Para el tratamiento 5 con respecto a los tratamientos 4 y 3 son estadísticamente iguales.

Cuadro N° 8: Comparación de medias entre los cinco tratamiento según el número de yemas contaminadas.

Tratamiento	Promedio	Tukey Agrupamiento
2	5,0825	a
3	3,5150	b
4	2,8067	b c
5	2,2650	d c
1	1,5030	d

Las letras a, b, c y d indican grupos de tratamientos estadísticamente diferentes, según

la prueba de Tukey, usando un $\alpha=0.05$.

En cuanto a la comparación de medias de Tukey se tiene que el tratamiento 2 es estadísticamente diferente con respecto a los demás tratamientos, se produjo mayor contaminación.

5.2.- Segunda Etapa: Multiplicación del material obtenido en frascos.

La aplicación tres tratamientos permitió establecer el mejor medio multiplicación y mayor número de brotes. Se encontró diferencias significativas en relación al tipo de tratamiento, ver el anexo N° 6. Se puede notar que el tratamiento que permite la formación de un mayor número de brotes ver el anexo N° 7. El procedimiento para seguir en la toma de datos se puede ver en el anexo N° 11.

Cuadro N° 9: Comparación de medias en la etapa intermedia (frascos) entre los tres tratamiento según el número de brotes.

Tratamiento	Promedio	Tukey Agrupamiento
2.1 : 0.3	1.7675	a
2 : 1.8 : 2	1.49333	a
0 : 0	1.31	a

La letra a indica que los tratamientos no se diferencian estadísticamente, según la prueba de Tukey, usando un $\alpha=0.05$.

En cuanto a la comparación de medias de Tukey se tiene que los tratamientos son estadísticamente similares. Sin embargo el tratamiento (2.1: 0.3) presento una media superior y este se adaptó bien al colocarlo en los frascos de crecimiento, llegando hasta casi los 8 cm, ver el anexo N° 5.

Cuadro N° 10: Comparación de medias en la etapa intermedia (frascos), entre los tres tratamiento según el número de hojas.

Tratamiento	Nº de observados	Promedio	Tukey Agrupamiento
2 : 1.8 : 2	10	6.9	a
0 : 0	10	6	b
2.1 : 0.3	10	5.1	b

Las letras a y b indican grupos de tratamientos estadísticamente diferentes, según la prueba de Tukey, usando un $\alpha=0.05$.

En cuanto a la comparación de medias de Tukey se tiene que el tratamiento es (2: 1.8: 2) es estadísticamente diferente con respecto a los demás tratamientos. Los tratamientos (0: 0) y (2.1: 0.3) son estadísticamente iguales. Esto relacionado a la presenta de un complemento de vitaminas que contribuyeron a que la calidad de la planta sea mejor.

Cuadro N° 11: Comparación de medias en la etapa intermedia (frascos), entre los tres tratamiento según la altura de la planta.

Tratamiento	Nº de observados	Promedio	Tukey Agrupamiento
2 : 1.8 : 2	10	2.727	a
0 : 0	10	1.68	b
2.1 : 0.3	10	1.515	b

Las letras a y b indican grupos de tratamientos estadísticamente diferentes, según la prueba de Tukey, usando un $\alpha=0.05$.

En cuanto a la comparación de medias de Tukey se tiene que el tratamiento (2: 1.8: 2) es estadísticamente diferente con respecto a los demás tratamientos. Los tratamientos (0: 0) y (2.1: 0.3) son estadísticamente iguales.

Cuadro N° 12: Comparación de medias en la etapa intermedia (frascos), entre los tres tratamientos según el diámetro de la planta.

Tratamiento	Nº de observados	Promedio	Tukey Agrupamiento
2 : 1.8 : 2	10	0.814	a
2.1 : 0.3	10	0.729	b
0 : 0	10	0.682	b

Las letras a y b indican grupos de tratamientos estadísticamente diferentes, según la prueba de Tukey, usando un $\alpha=0.05$.

En cuanto a la comparación de medias de Tukey se tiene que el tratamiento (2: 1.8: 2) es estadísticamente diferente con respecto a los demás tratamientos. Los tratamientos (0: 0) y (2.1: 0.3) son estadísticamente iguales.

Cuadro N° 13: Comparación de medias en la etapa intermedia (frascos) entre los tres tratamientos según el peso fresco de la planta.

Tratamiento	Nº de observados	Promedio	Tukey Agrupamiento
2 : 1.8 : 2	10	1.8719	a
0 : 0	10	0.6554	b
2.1 : 0.3	10	0.5077	b

Las letras a y b indican grupos de tratamientos estadísticamente diferentes, según la prueba de Tukey, usando un $\alpha=0.05$.

En cuanto a la comparación de medias de Tukey se tiene que el tratamiento (2:1.8: 2) es estadísticamente diferente con respecto a los demás tratamientos. Los tratamientos (0: 0) y (2.1: 0.3) son estadísticamente iguales.

Cuadro N° 14: Comparación de medias para la etapa intermedia (frascos) entre los tres tratamientos según el peso seco de la planta.

Tratamiento	Nº de observados	Promedio	Tukey Agrupamiento
2 : 1.8 : 2	10	0.40620	a
0 : 0	10	0.39200	a
2.1 : 0.3	10	0.37080	a

La letra a indica que los tratamientos no se diferencian estadísticamente, según la prueba de Tukey, usando un $\alpha=0.05$.

En cuanto a la comparación de medias de Tukey se tiene que el tratamiento (2: 1.8: 2) es estadísticamente diferente con respecto a los demás tratamientos. Los tratamientos (0: 0) y (2.1: 0.3) son estadísticamente iguales.

5.3.- Tercera etapa: Multiplicación del material en biorreactores.

Cuadro N° 15: Comparación de medias en la fase final (biorreactores), entre los tres tratamientos según la altura de la planta.

Tratamiento	Nº de observados	Promedio	Tukey Agrupamiento
2 : 1.8 : 2	50	2.57	a
0 : 0	50	2.48	a
2.1 : 0.3	50	1.58	b

Las letras a y b indican grupos de tratamientos estadísticamente diferentes, según la prueba de Tukey, usando un $\alpha=0.05$.

Los resultados de análisis de varianza nos demuestra que hay diferencias estadísticas entre los tratamientos con un nivel de confianza del 95% y obteniendo un coeficiente de variación del 19.30 %; en cuanto a la comparación de medias de Tukey se tiene que los tratamientos (2: 1.8: 2) y (0: 0) son similares estadísticamente, con respecto a la altura de plantas de, pero diferentes del tratamiento (2.1: 0.3), (tabla 10).

Cuadro N° 16: Comparación de medias en la fase final (biorreactores) entre los tres tratamientos según el número de hojas.

Tratamiento	Nº de observados	Promedio	Tukey Agrupamiento
0 : 0	50	2.915	a
2 : 1.8 : 2	50	2.781	a
2.1 : 0.3	50	2.582	a

La letra a indica que los tratamientos no se diferencian estadísticamente, según la prueba de Tukey, usando un $\alpha=0.05$.

Para el número de hojas el análisis de varianza nos demuestra que no hay diferencias estadísticas entre los tratamientos con un nivel de confianza del 95%, en cuanto a la comparación de medias de Tukey se tiene que los tratamientos son estadísticamente iguales.

Cuadro N° 17: Comparación de medias de la fase final (biorreactores) entre los tres tratamientos según el diámetro de la planta.

Tratamiento	Nº de observados	Promedio	Tukey Agrupamiento
0 : 0	50	0.828	a
2 : 1.8 : 2	50	0.789	a
2.1 : 0.3	50	0.7292	a

La letra a indica que los tratamientos no se diferencian estadísticamente, según la prueba de Tukey, usando un $\alpha=0.05$.

Según el análisis de varianza nos demuestra que no hay diferencias estadísticas entre los tratamientos con un nivel de confianza del 95%, en cuanto a la comparación de medias de Tukey se tiene que los tratamientos tienen la misma media y son estadísticamente iguales.

Cuadro N° 18: Comparación de medias de la fase final (biorreactores) entre los tres tratamientos según el peso fresco de la planta.

Tratamiento	Nº de observados	Promedio	Tukey Agrupamiento
0 : 0	50	1.2782	a
2 : 1.8 : 2	50	1.213	a
2.1 : 0.3	50	0.7238	b

Las letras a y b indican grupos de tratamientos estadísticamente diferentes, según la prueba de Tukey, usando un $\alpha=0.05$.

Los resultados de análisis de varianza nos demuestra que hay diferencias estadísticas entre los tratamientos con un nivel de confianza del 95%, en cuanto a la comparación de medias de Tukey se tiene que los tratamientos (0 : 0) y (2 : 1.8 : 2) tienen la misma media estadísticamente, con respecto al peso fresco con una media de 1.28 y 1.21cm; en segundo lugar ocupa el tratamiento (2.1 : 0.3) con una media de 0.72cm.

Cuadro N° 19: Comparación de medias de la fase final (biorreactores) entre los tres tratamientos según el peso seco de la planta.

Tratamiento	Nº de observados	Promedio	Tukey Agrupamiento
0 : 0	50	0.6658	a
2 : 1.8 : 2	50	0.6214	a
2.1 : 0.3	50	0.4166	b

Las letras a y b indican grupos de tratamientos estadísticamente diferentes, según la prueba de Tukey, usando un $\alpha=0.05$.

Los resultados de análisis de varianza nos demuestra que hay diferencias estadísticas entre los tratamientos con un nivel de confianza del 95%, en cuanto a la comparación de medias de Tukey se tiene que los tratamientos (2 : 1.8 : 2) y (0 : 0) tienen la misma media estadísticamente, con respecto a la altura de plantas de 2.57 cm y 2.47 cm; en segundo lugar ocupa el tratamiento (2.1 : 0.3) con una media de 1.58 cm.

Cuadro N° 20: Comparación de medias de la fase final (biorreactores) entre los tres tratamientos según la tasa de multiplicación.

Tratamiento	Nº de observados	Promedio	Tukey Agrupamiento
2.1 : 0.3	50	11	a
2 : 1.8 : 2	50	4.8	b
0 : 0	50	3.4	b

Las letras a y b indican grupos de tratamientos estadísticamente diferentes, según la prueba de Tukey, usando un $\alpha=0.05$.

Para la tasa de multiplicación el análisis de varianza nos demuestra que hay diferencias estadísticas entre los tratamientos esto con un nivel de confianza del 95% y la comparación de media Tukey nos demuestra que el tratamiento (2.1: 0.3) con una media de 11 plantas por cada 2 meses se proliferan superior que los demás tratamientos.

VI.- DISCUSIÓN

Los resultados muestran que se logró establecer un protocolo *in vitro* de piña *Ananas comosus* (L. Merr.), así como determinar las mejores concentraciones de reguladores de crecimiento en el establecimiento y multiplicación.

El tratamiento más adecuado para la introducción y desinfección de yemas es el tratamiento 5 (25% de lejía por 10' para la primera desinfección y 15% de lejía por 10' para la segunda desinfección), la cual se caracteriza por tener porcentajes de lejía bajos y tiempos intermedios de exposición a estas concentraciones. Esto asegura la limpieza y además daña en menor grado a las células de las yemas, permitiendo así su proliferación y multiplicación.

Para el establecimiento de piña Var. MD, la mejor concentración del medio de cultivo está conformado por la totalidad de las sales del MS y suplementado con BAP (2.1 mg L⁻¹); y ANA (0.3 mg.L⁻¹) obteniéndose una tasa del 11 y un alto porcentaje de proliferación 45%.

Las concentraciones hormonales del presente trabajo se determinaron en base a la bibliografía recopilada, optándose por utilizar el rango de (1 – 4 mg. L⁻¹) con respecto al BAP y (1 – 2 mg. L⁻¹) para ANA.

El tiempo de inmersión influyó de forma significativa en el coeficiente de multiplicación. Con el tratamiento 2 (BAP 2.1: ANA 0.3) de inmersión se alcanzó los mejores resultados, con diferencias significativas respecto al resto de los tratamientos.

EL mecanismo de inmersión automatizada permite el adecuado suministro de oxígeno, por lo tanto no ocurren deficiencias como las observadas por Santos et al. (2011). Escalona (1999), Berthouly y Etienne (2005) señalaron la necesidad de determinar el tiempo de inmersión para cada una de las fases del cultivo en la micropropagación.

La tasa de multiplicación de 11, también es algo favorable observado para el tratamiento 2 (BAP 2.1: ANA 0.3), utilizando el sistema de inmersión automatizado para un litro en el contenedor, cercano a una tasa de 13 obtenido en malanga (*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schott) en frascos de 10 L de capacidad (Dottin, 2000). Basail (2005) obtuvo el mejor resultado para la tasa de multiplicación, cuando utilizó 10 minutos de inmersión de los explantes en el medio de cultivo, en el cultivar híbrido de plátano vianda “FHIA 21” (AAAB). Es muy importante el tiempo de inmersión, en la multiplicación, en sistemas de inmersión temporal ya que determinan la absorción de nutrientes (Berthouly and Etienne, 2005).

Al evaluar el coeficiente de multiplicación con un intervalo de inmersión de 3 horas se obtuvieron buenos resultados, con ciertas diferencias significativas en los distintos parámetros evaluados para los 3 tratamientos.

Al utilizar la frecuencia de inmersión cada 3 horas se alcanzaron los buenos resultados en la multiplicación de los brotes en las variables evaluadas. Estos brotes se caracterizaron por su coloración verde y buen desarrollo foliar.

Los resultados obtenidos con una frecuencia de inmersión de cada 3 horas para la multiplicación de los brotes y yemas pudieron deberse a que se logró una adecuada renovación en la composición de los gases que conforman la atmósfera interna del frasco de cultivo en comparación. Un aumento en la concentración de oxígeno en el interior del recipiente, puede haber ocasionado un incremento en la fotorespiración de los brotes de las yemas limitando su crecimiento. Una renovación más sistemática de la atmósfera interna del recipiente, contribuyó a obtener explantes de buena calidad en la multiplicación de brotes (Teisson *et al.*, 1996, Kozai *et al.*, 1997 y McAlister *et al.*, 2005). Dottin (2000).

Las yemas de la corona de piña cultivada con un volumen de 1 litro, de medio de cultivo, mostraron multiplicación en los 3 tratamientos. Con este volumen se aseguró

un adecuado equilibrio entre las necesidades de nutrientes de los brotes de yemas de corona y la disponibilidad de los mismos en el medio de cultivo (Berthouly & Etienne, 2005). Lorenzo *et al.* (1998) observaron un incremento en el crecimiento y la multiplicación de brotes de caña de azúcar (*Saccharum* sp.), desde 8,3 hasta 23,9, en 30 días de cultivo, cuando aumentaron el volumen de medio de cultivo de 5,0 ml a 50 ml por brotes en sistemas de inmersión temporal.

Por su parte, Escalona (1999) determinó que para el crecimiento y multiplicación de brotes de piña (*Ananas comosus* L. Merr), es necesario 200 ml de medio de cultivo por brote, además comprobó que los volúmenes de medios de cultivo superiores a 200 ml por brote limitan el coeficiente de multiplicación. Sin embargo la presente investigación resulto adecuado para un volumen de 1 litro utilizando 30 explantes.

Con respecto a la variable de altura hubo diferencias significativas entre los tratamientos estudiados, teniendo así que el tratamiento control presento mayor altura, sin embargo no tenía una buena tasa de multiplicación. Es decir que la mayor longitud se evidenció en el testigo (sin hormonas) pero se obtuvo un bajo porcentaje de proliferación. Pero utilizando el tratamiento BAP 2.1: ANA 0.3, se logró realizar un máximo aprovechamiento de los frascos de cultivo y mejorar la eficiencia en la fase de multiplicación.

Durante la evaluación de brotes se observó un buen comportamiento, presentando uniformidad de crecimiento, aspectos morfológicos y fisiológicos de acuerdo a los medios según el grado de nivel hormonal. Sin embargo se presentó la aparición de variación somaclonal, después de varios subcultivos, para esta investigación fue a partir del noveno subcultivo. Dottin (2000), en la multiplicación del clon de malanga "México 8", realizó subcultivos de brotes de yemas axilares a los 21 días de cultivo en multiplicación. Lo que demuestra la importancia de estudiar el tiempo de subcultivo en la multiplicación en los sistemas de inmersión temporal. Escalona (1999), para el

cultivo de la piña, demostró que los períodos prolongados promueven la deformación de los brotes y, por lo tanto, afectan el número de brotes que se puede obtener.

VII. CONCLUSIONES

- ✓ El protocolo de desinfección óptimo para realizar la introducción de las yemas de la corona de piña fue mediante el uso del tratamiento T5 (25% de lejía por 10 minutos para la primera desinfección y 15% de lejía por 10 minutos' para la segunda desinfección).
- ✓ El mejor medio de cultivo para la obtención de un mayor número de brotes en la multiplicación fue el tratamiento 2 (BAP 2.1: ANA 0.3), con una tasa de multiplicación de 11.
- ✓ Se logró establecer un protocolo más eficiente para la multiplicación de piña en un sistema de inmersión temporal, conformado por frasco de cultivo de 1litro de capacidad. El mejor comportamiento del material y el coeficiente máximo de multiplicación alcanzado fue de 11, logrado a un volumen de 1 litro en el contenedor con 30 explantes y una inmersión con 3 horas de intervalo.
- ✓ El tamaño de la planta en un tratamiento no tiene relación directa con la tasa de multiplicación, para la presente investigación.
- ✓ La probabilidad de aparición de variación somaclonal es mayor a partir del noveno subcultivo, para la presente investigación.

VIII. RECOMENDACIONES

- A partir del noveno subcultivo se debe hacer introducciones para mantener la tasa de multiplicación y evitar la presencia de variaciones somaclonales.
- Sería interesante probar volúmenes mayores para este sistema de inmersión temporal en piña, así como la cantidad de explantes óptimos a considerar.
- Probar otra concentración adecuada de hormonas, que permita tener una tasa de multiplicación y un buen tamaño de planta.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARADO M. 1992. Propagación vegetativa "in Vitro" del Papayo (*Carica papaya* L.), tesis para optar el título de Biólogo. Lima - Peru. 13: 56 p.

BARTHOLOMEW D; PAULL R.; ROHRBACH K. 2003. The Pineapple: Botany, Production and Uses. UK. CAB. Internacional. 290 p.

BASAIL M. 2005. Multiplicación en sistema de inmersión temporal del cultivar híbrido 'FHIA 21' (AAAB). Tesis de Maestría. Universidad Central de Las Villas, Instituto de biotecnología de las plantas, Cuba. 85 p.

BELLO, A. 1991. El cultivo de la piña en la selva central del Perú. Perú. PICT, INIAA. 46 p. (Inf. Tec. N°15).

BERTHOULY M. & ETIENNE H. 2005. Temporary immersion systems: a new concept for use liquid medium in mass propagation. En: Hvoslef-Eide, A. K. and Preil, W. (Ed). Liquid Culture Systems or in vitro Plant Propagation. 165 -195 p.

CABOT C.; LACOEUILHE J. 1990. A genetic hybridization programme for improving pineapple quality. Acta Horti 275: 395 – 400 p.

COLLINS J. 1960. The pineapple: Botany, Cultivation and Utilization. Interscience Publishers. New York. 295 p.

DAQUITA M.; BENEGAS R. 1997. Brief review of tissue cultura of pineapple. Pineapple Newsl. 3:7 – 9 p.

DAQUITA M.; CISNERO A.; RODRIGUEZ Y.; ESCALONA M.; PEREZ, M.; LUNA I.; BORROTO C. 1997. Somatic Embryogenesis in pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.). In: Martin- Prevel, P.; Hugon, R., eds. Proc. Second Int. Pineapple Symp. Acta Horticulturae. 425, 241 – 257 p.

DESJARDINS Y. 1995. Photosynthesis in vitro on the factors regulating CO₂ assimilation in micropropagation systems. Acta Hort. 393: 345-353.

DOTTIN M. 2000. Propagación *in vitro* de la malanga (*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schott). Tesis presentada para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Central de Las Villas. Santa Clara, Cuba.

ESCALONA M. 1999. Propagación de la piña [*Ananas comosus* (L.) Merr.] en sistemas de inmersión temporal. Tesis para aspirar al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad de Ciego de Ávila, Centro de Bioplasmas. Cuba. 102 p.

ESCALONA M. LORENZO J C. 1998. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. Plant Cell Repts (1999).

ESCALONA M.; LORENZO J.; GONZALES B.; DAQUITA M.; FUNDONA Z.; BORROTO, C.; ESPINOSA, D.; ARIAS, E.; ASPIOLEA, E. 1998. New system for in vitro propagation of pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merrn]. Tropical Fruits Newsletter 29: 3 - 5 p.

ESCALONA M.; LORENZO J.; GONZALEZ B.; DAQUITA M. 2002. Production of pineappel transgenic plants assisted by temporary inmersión bioreactors. Plant Cell Rep 21: 136 -140 p. Centro de Bioplasmas. Universidad de Ciego de Avila, Cuba.

ETIENNE E.; BERTHOULY M. 2002. Temporary inmersión systems in plant micropropagation: Plant Cell Tiss. Organ Cult. 69 215-231 p.

FIGUEROA R.; WARLF C.; FRANCIOSI R.; VAN O. 1970. El cultivo de la piña en el Perú. Lima. MA. 35 p. (Boletín técnico N°75).

GONZALEZ J.; DESJARDINS. 1999. Pineapple micropropagation in temporary immersion systems: Plant Cell rep. 18: 743 – 748 p.

GOMEZ L. 2000. Micropropagación de la variedad de piña Champaka F- 153. Centro de Investigaciones Agronomicas. Universidad de Costa Rica.

INGA H. 2006. Estandarización de una metodología de microinjerto en mandarina. Tesis Magister Scientiae en producción Agrícola. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima - Peru. 76: 5 – 6 p.

KOZAI T.; KUBOTA C. H. & JEONG B. 1997. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 51: 49 – 56 p.

LOAL F.; ANTONI M. 1980. Descripción y clave de las variedades de piña cultivadas en Venezuela Rev. Fac. Agron. 29:51 – 72 p.

LOEILLET D. 1997. The world pineapple market: the importance of Europe. Acta Hort. 425:37 – 48 p.

LOZOLA H. GARCIA G., Growth inhibitors in Potato *in vitro* II. Alar and Paclobutrazol. Agrociencia vol 30. Chapingo – Mexico: 375 – 381 p.

MCALISTER B.; FINNIE J.; Watt M. & Blakeway F. 2005. Use of the temporary immersion bioreactor system (RITA) for production of commercial Eucalyptus clones Mondi Forests. Plant Cell Tissue and Organ. 81: 347- 358 p.

MONTES M. 2008. Propagación clonal *in vitro* de hijos de la corona de piña de azucarón (*Ananas comosus*) 4^{ta} publicación. Revista virtual de la Universidad Católica de Occidente. Santa Ana, El Salvador.

NAVILLE, PIERRE Sociología del trabajo, Mexico, Fondo de cultura economica 1976.

POSPISILOVA J.; CATSKY J.; SESTA K. 1997. Photosynthesis in plants cultivated *in vitro*. In: Pessaraki, M. New York: Marcel Dekker. 525 - 540 p.

PY, C.; GUYOT, A. 1970. La floraison controlee de l'ananas par l'éthrel, nouvea regulator de croissance (1ére partie). Fruits 25(4): 253 – 261 p.

PY, C.; LACOHEVILHE, I.; TEISSON, C. 1987. The pineapple, cultivation and uses. Ed. G.P. maisonneure et Lorose, Perís. 568 p.

ROHRBACH, K. 1986. Nematode and disease problems of pineapple. *Plant disease* 70:81 – 87 p.

SAUCEDO S. 2008. Tesis: Propagación clonal in vitro de piña (*Ananas comosus* L. Merr) variedades Champaka y Hawaiana. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Ecuador.

SENAMHI. 2009. Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú. Boletín Hidrometeorológico del Perú. Año IX-Nº09-Setiembre 2009. Perú. 16 p.

TEISSON C.; ALVARD D.; BERTHOULY M.; Cote, F., ESCALANT J.; Etienne, H. & LARTAND M. 1996. Simple apparatus to perform plant tissue culture by temporary immersion. *Acta Hort.* 440: 521 – 526 p.

TEISSON C.; ALVARD D. 1995. A new concept of plant in vitro cultivation liquid medium: temporary immersion: In: Terri M.; Celia, R.; Falavigna, A. eds. Current issues in plant molecular and celular biology. Dordrecht: kluwer Academic Publishers.105-110 p.

TRUJILLO I.; BORMAN L. 2007. Proceso de multiplicación in vitro de piña (*Ananas comosus* L. Merrill) a través de sistema de inmersión temporal tipo RITA.Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez. Venezuela.

VILLAREAL F. 2008. Estudio preliminar del establecimiento del cultivo in vitro de palto *Persea Americana* Mill. Tesis para optar por el título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima – Peru. 14 – 24p.

ZIV, M. 1995. In vitro acclimatization automation and environmental control in plant tissue cultura. 493 – 516 p.

Paginas web:

<http://www.freshplaza.es/news_detail.asp?id=33805>.

Acceso: 30/01/10; 9:50 pm.

<<http://es.bsherpas.com/index.php/proyectos/fomento-para-el-cultivo-de-pina-md-2.html>>. Acceso: 1/02/10; 10: 43 pm.

<<http://www.fao.org/inpho/content/compand/text/ch33s/AE614s01.htm>>.

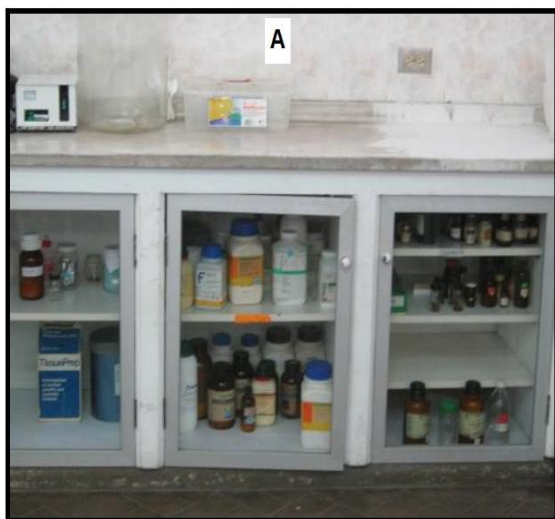
Acceso: 1/ 02/10; 10:50 pm.

<<http://spanish.bolivia.usembassy.gov/incsr2009.html>>

Acceso: 11/ 02/10; 2:26 am

X. ANEXO

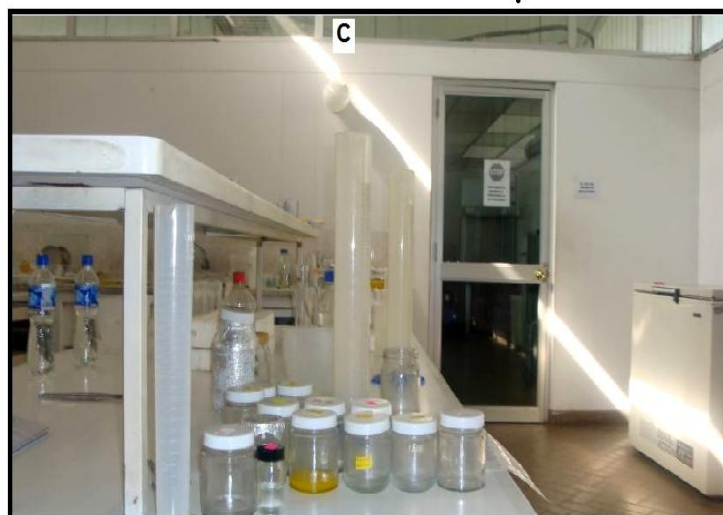
Anexo N°1: Preparación de medios de cultivo y soluciones stock



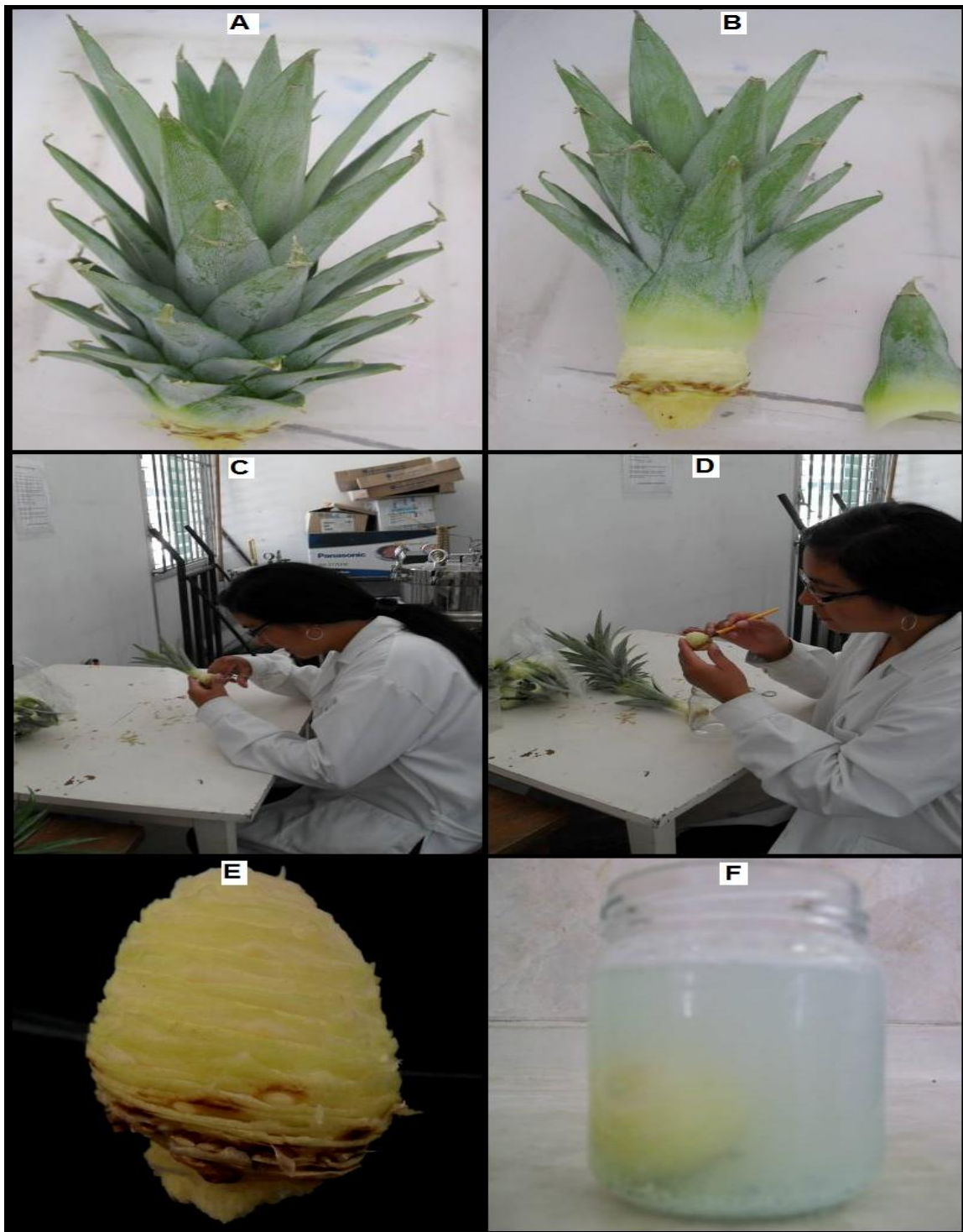
A - Reactivos de cultivo in vitro

B - Cuantificación de Reactivos

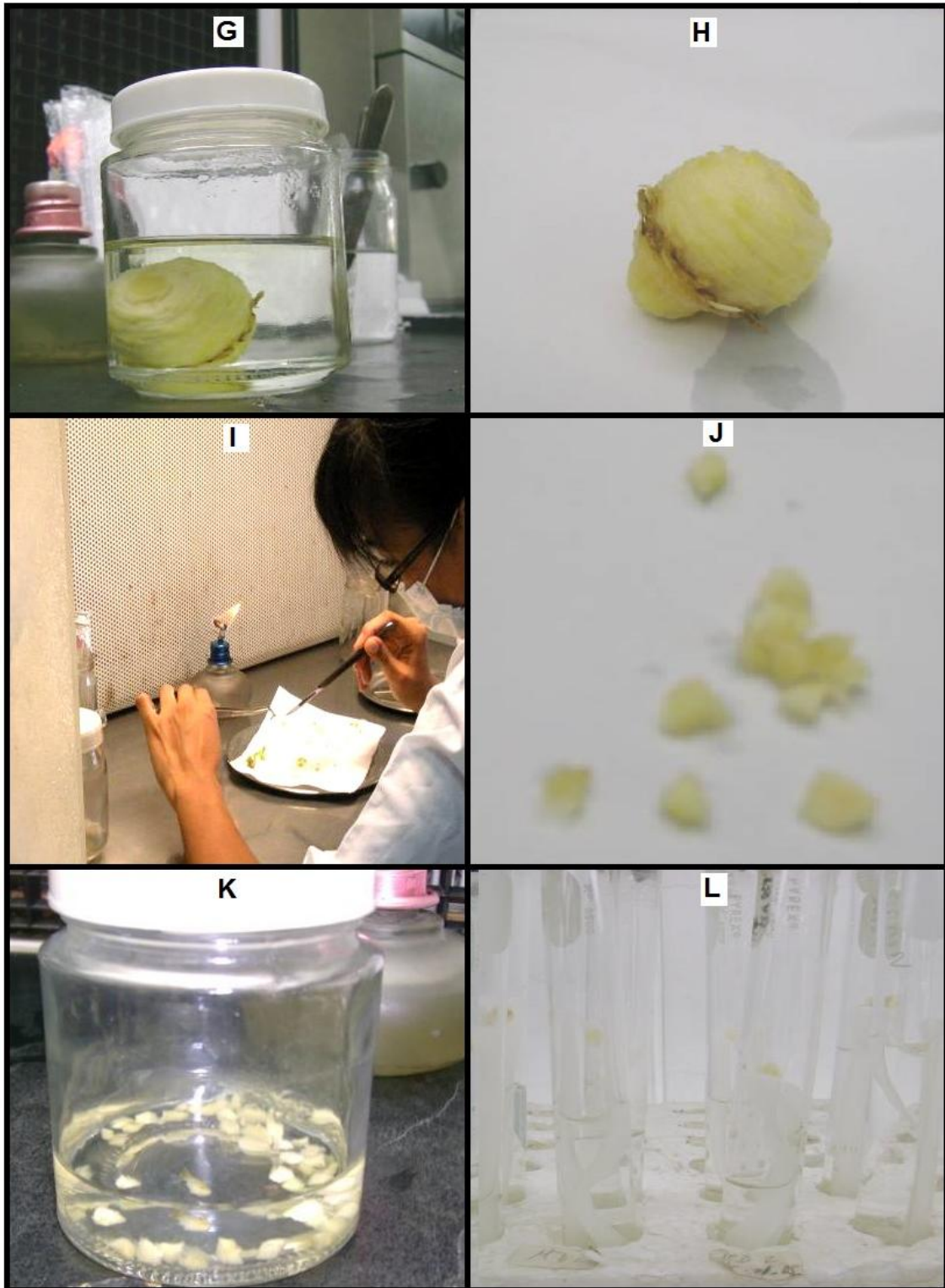
C - Soluciones stock preparadas



Anexo N°2: Introducción de yemas de la corona de piña



A y B: material biológico e identificación de la corona; C y D: asilamiento de la corona
E y F: Corona aislada y pre-tratada



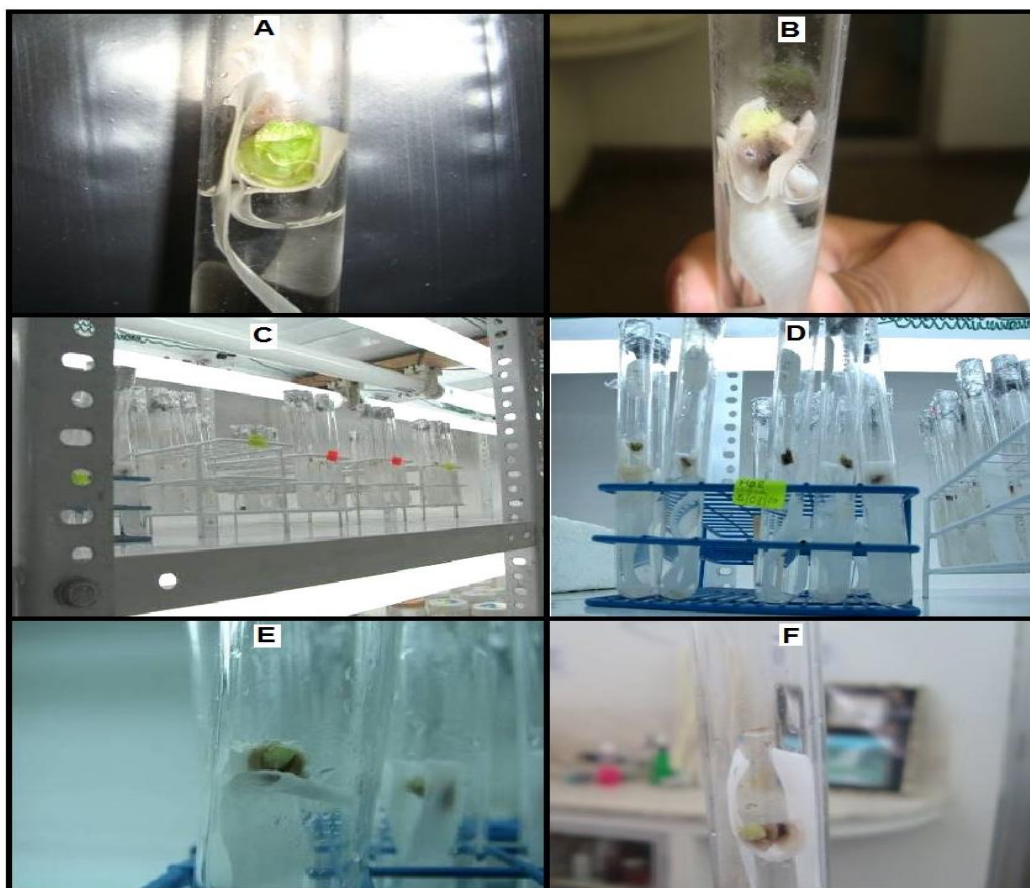
G y H: primera desinfección de la corona y corona desinfectada; I y J: Extracción de yemas de la corona y yemas extraídas; K: desinfección de yemas; L: yemas colocadas en tubos con medio.

Anexo N°3: Yemas introducidas



Instalación de los tratamientos 1, 2, 3, 4 y 5.

Anexo N°4: Resultados de las introducciones



A: tratamiento 1; B: brote de 20 días; C: tratamiento 2; D: tratamiento 3; E: tratamiento: 4; F: tratamiento 5.

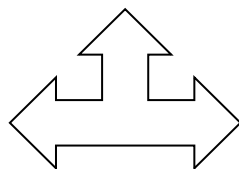
Anexo N°5: Traspase a frascos 23/03/10



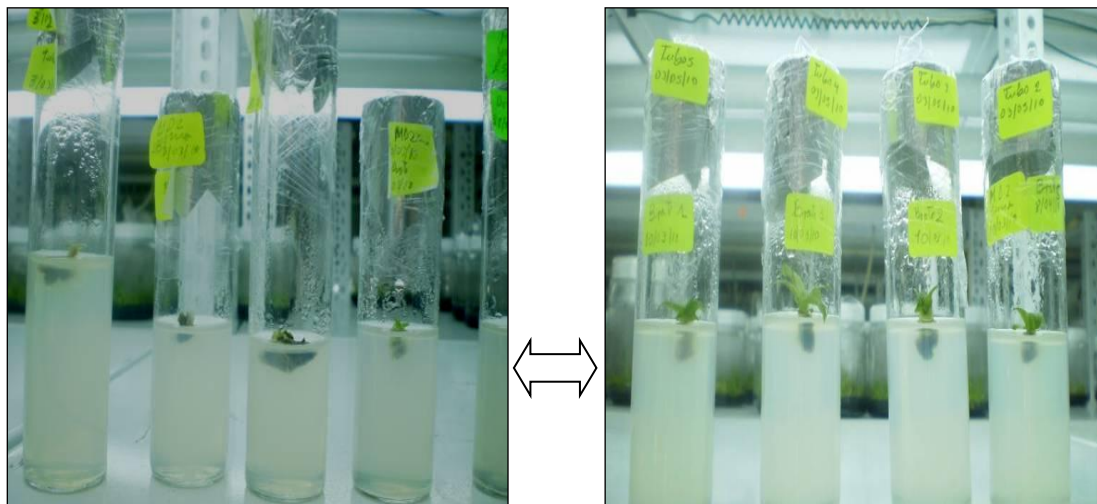
Después se dejaron crecer más para luego pasar a otro medio de proliferación.



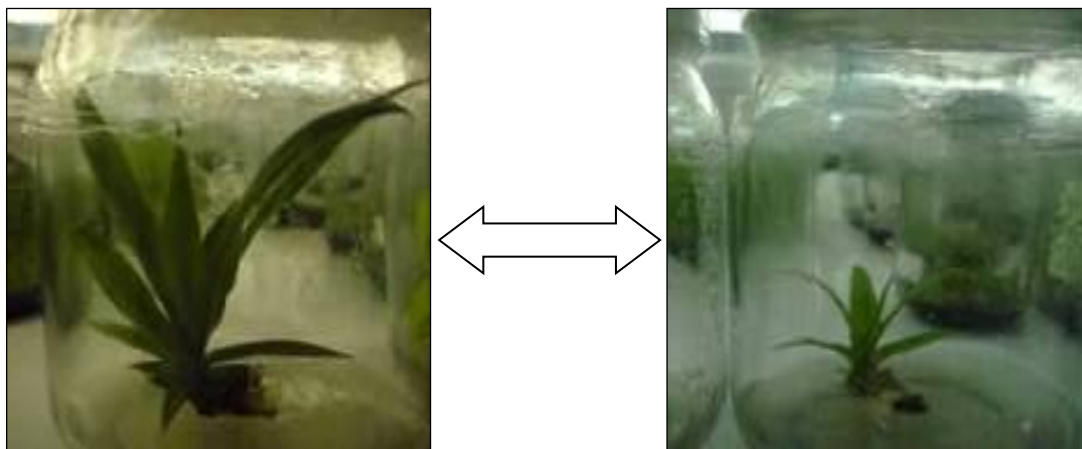
Plantas desarrolladas al cabo de un mes y medio.



Plantas en pleno desarrollo usando medio de proliferación.

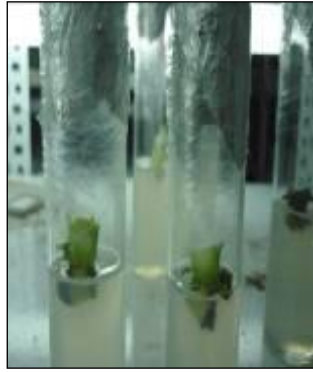
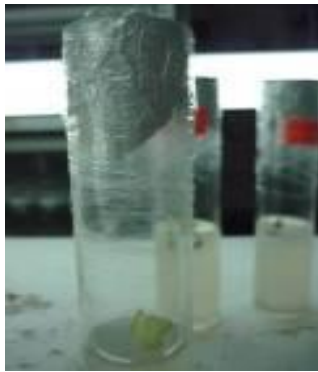


Yemas introducidas con crecimiento libre de contaminación.

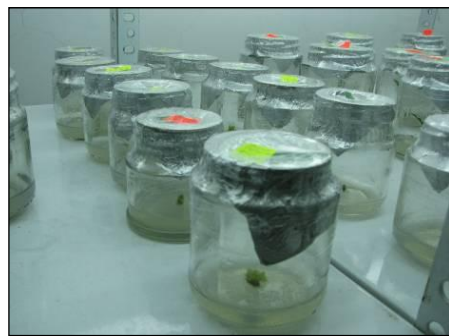
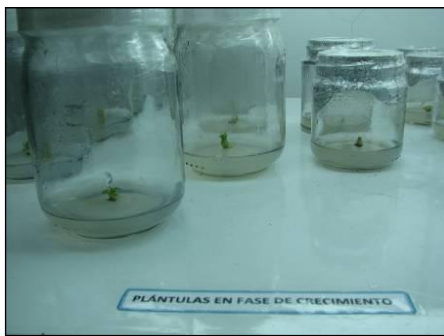


Plántulas que tienen aprox 4 meses desde su introducción (1^{er} grupo)

Anexo N°6: Primer subcultivo



Se realizaron cortes longitudinales a las plántulas para lograr una rápida proliferación. Se marcaron como clon 1 hasta el clon 4. Pruebas realizadas el 7 / 7 /10.



Plántulas para realizar su primer subcultivo.



Después de 7 días se obtuvieron resultados, las plántulas ya comenzaron a brotar
Evaluación 14 / 07/ 10



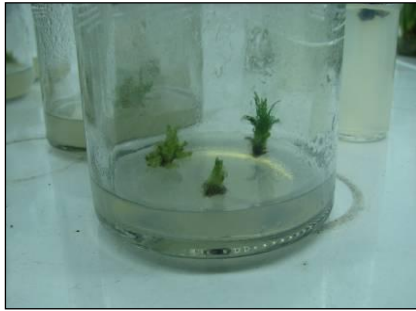
Plántulas del 1^{er} subcultivo

Anexo N°7: Yemas introducidas del 2^{do} tratamiento



Plántulas proliferando sin necesidad de estimular después de 23 días.

Anexo N°8: Yemas introducidas en el 3° tratamiento

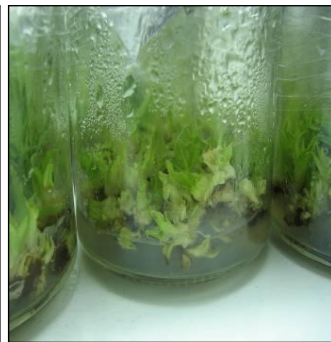


Pequeños brotes en crecimiento.

Anexo N°9: Selección del material

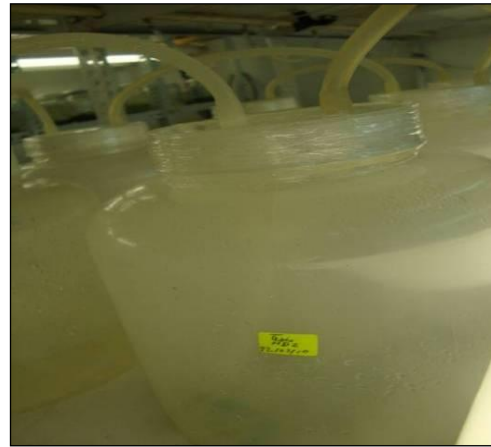


Selección del material para los experimentos de fase intermedia y final.



Se prefirió los que tienen más brotes en grupo.

Anexo N°10: Instalación de biorreactores



Instalación del 1° tratamiento



Instalación del 2° tratamiento



Instalación del 3° tratamiento



Después de 30 días



Después de 60 días

Anexo N°11: Evaluación

A los 60 días de propagación en el biorreactor



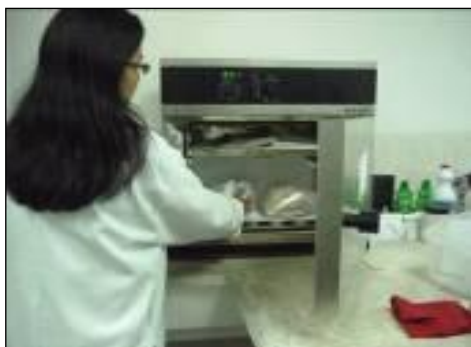
Macollo



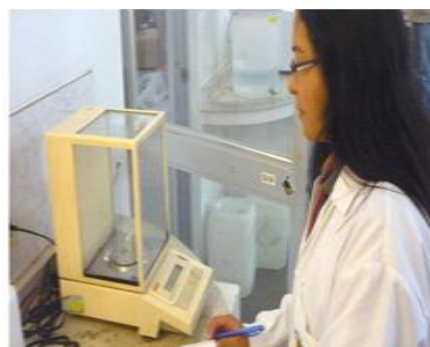
Separación para su evaluación.



Medición de plantulas.



Secado de las plántulas



Pesado las muestras secas

Anexo N°12. Experimento I: Introducción de yemas de la corona de la piña.

A. Yemas diferenciadas

a) Análisis de varianza para yemas diferenciadas

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F-calculado	P-value
Tratamientos	3	7.918	2.639	7.14	0.0009
Error de muestreo	30	11.084	0.369		
Total	33	19.002			
CV	31.34				
Media	1.94				

Para yemas diferenciadas el análisis de varianza muestra significancia estadística, con un nivel de confianza del 95% y un coeficiente de variabilidad de 31.34 %.

b) Comparación de medias entre los tres tratamientos según el número de yemas diferenciadas

Tukey Agrupamiento	Media	Tratamiento
a	2.46714	4
a b	1.82200	3
b	1.34750	1
b	1.20500	2

Las letras a y b indican grupos de tratamientos estadísticamente diferentes, según la prueba de Tukey, usando un $\alpha=0.05$.

B. Yemas no diferenciadas

a) Análisis de varianza para yemas no diferenciadas

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F-calculado	P-value
Tratamientos	3	31.340	10.446	29.45	0.0001
Error de muestreo	35	12.414	0.354		
Total	38	43.754			
CV	14.52				
Media	4.10				

Para yemas no diferenciadas el análisis de varianza muestra significancia estadística, con un nivel de confianza del 95% y un coeficiente de variabilidad de 14.52%.

b) Comparación de medias entre los tres tratamientos según el número de yemas no diferenciadas

Tukey Agrupamiento	Media	Tratamiento
a	5.22800	1
b	4.15188	4
b	3.58900	3
c	1.79333	2

Las letras a, b y c indican grupos de tratamientos estadísticamente diferentes, según la prueba Tukey, usando un $\alpha=0.05$.

La comparación de medias por Tukey indica que el tratamiento 1 y 2 es estadísticamente diferente respecto a los tratamientos 4 y 3 (estadísticamente iguales).

C. Yemas contaminadas

a) Análisis de varianza para yemas contaminadas

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F-calculado	P-value
Tratamientos	3	34.162	11.387	33.79	0.0001
Error de muestreo	34	11.459	0.337		
Total	37	45.621			
CV	20.06				
Media	2.89				

Para yemas contaminadas el análisis de varianza muestra significancia estadística, con un nivel de confianza del 95% y un coeficiente de variabilidad de 20.06%.

b) Comparación de medias entre los tres tratamientos según el número de yemas contaminadas.

Tukey Agrupamiento	Media	Tratamiento
a	5.22800	1
b	4.15188	4
b	3.58900	3
c	1.79333	2

Las letras a, b y c indican grupos de tratamientos estadísticamente diferentes, según la prueba Tukey, usando un $\alpha=0.05$.

La comparación de medias por Tukey indica que el tratamiento 1 y 2 es estadísticamente diferente con respecto a los tratamientos 4 y 3 (estadísticamente iguales).

Anexo N°13. Experimento II: Propagación en cultivo *in Vitro* de la piña en frascos.

A. Números de brotes

a) Análisis de varianza para la etapa intermedia (frascos) el número de brotes.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F calculado	P-value
Tratamientos	2	0.683	0.341	2.84	0.0880
Error de muestreo	16	1.925	0.120		
Total	18	2.609			
CV	22.23				
Media	1.56				

Para el número de brotes el análisis de varianza muestra que no hay significancia estadística, con un nivel de confianza del 95% y un coeficiente de variabilidad de 22.23 %.

b) Comparación de medias en la etapa intermedia (frascos) entre los tres tratamientos según el número de brotes.

Tukey Agrupamiento	Media	Tratamiento
a	1.76750	2
a	1.49333	3
a	1.31000	1

La letra a indica que los tratamientos no se diferencian estadísticamente, según la prueba de Tukey, usando un $\alpha=0.05$.

La comparación de medias por Tukey indica que los tratamientos son estadísticamente iguales.

B. Número de hojas

a) Análisis de varianza para la etapa intermedia (frascos) del número de hojas

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F calculado	P-value
Tratamientos	2	16.200	8.100	6.88	0.0039
Error de muestreo	27	31.800	1.178		
Total	29	18			
CV	18.09				
Media	6				

Para el número de hojas su análisis de varianza muestra significancia estadística, con un nivel de confianza del 95% y un coeficiente de variabilidad de 18.09%

b) Comparación de medias de la etapa intermedia (frascos) entre los tres tratamientos según el número de hojas.

Tukey Agrupamiento	Media	Tratamiento
a	6.9000	3
b	6.0000	1
b	5.1000	2

Las letras a y b indican grupos de tratamientos estadísticamente diferentes, según la prueba de Tukey, usando un $\alpha=0.05$.

La comparación de medias por Tukey indica que el tratamiento 3 es estadísticamente diferente con respecto a los tratamientos 1 y 2, estos últimos son estadísticamente iguales.

C. Altura de la planta

a) Análisis de varianza para la etapa intermedia (frascos) de la altura de la planta

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F-calculado	P-value
Tratamientos	2	8.64126	4.3206	32.55	0.0001
Error de muestreo	27	3.58406	0.1327		
Total	29	12.2253			
CV	18.45				
Media	1.97				

Para la altura de la planta su análisis de varianza muestra significancia estadística, con un nivel de confianza del 95% y un coeficiente de variabilidad de 18.46 %.

b) Comparación de medias en la etapa intermedia (frascos) entre los tres tratamientos según la altura de la planta.

Tukey Agrupamiento	Media	Tratamiento
a	2.7270	3
b	1.6800	1
b	1.5150	2

Las letras a y b indican grupos de tratamientos estadísticamente diferentes, según la prueba de Tukey, usando un $\alpha=0.05$.

La comparación de medias por Tukey indica que el tratamiento 3 es estadísticamente diferente con respecto a los tratamientos 1 y 2, estos últimos son estadísticamente iguales.

D. Diámetro de la planta

a) Análisis de varianza para la etapa intermedia (frascos) el diámetro de la planta.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F-Calculado	P-valué
Tratamientos	2	0.089	0.045	5.72	0.008
Error de muestreo	27	0.211	0.008		
Total	29	0.300			
CV	11.92				
Media	0.74				

Para el diámetro de la planta su análisis de varianza muestra significancia estadística, con un nivel de confianza del 95% y un coeficiente de variabilidad de 11.92 %.

b) Comparación de medias en la etapa intermedia (frascos) entre los tres tratamientos según el diámetro de la planta.

Tukey Agrupamiento	Media	Tratamiento
a	0.81400	3
b	0.72900	2
b	0.68200	1

Las letras a y b indican grupos de tratamientos estadísticamente diferentes, según la prueba de Tukey, usando un $\alpha=0.05$.

La comparación de medias por Tukey indica que el tratamiento 3 es estadísticamente diferente con respecto a los tratamientos 1 y 2, estos últimos son estadísticamente iguales.

E. Peso fresco de la planta

a) Análisis de varianza para la etapa intermedia (frascos) el peso fresco de la planta.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F calculado	P-value
Tratamientos	2	11.209	5.605	92.69	0.0001
Error de muestreo	27	1.633	0.060		
Total	29	12.843			
CV	24.31				
Media	1.01				

Para el peso fresco de la planta su análisis de varianza muestra significancia estadística, con un nivel de confianza del 95% y un coeficiente de variabilidad de 24.31%.

b) Comparación de medias en la etapa intermedia (frascos) entre los tres tratamientos según el peso fresco de la planta.

Tukey Agrupamiento	Media	Tratamiento
A	1.8719	3
B	0.6554	1
B	0.5077	2

Las letras a y b indican grupos de tratamientos estadísticamente diferentes, según la prueba de Tukey, usando un $\alpha=0.05$.

La comparación de medias por Tukey indica que el tratamiento 3 es estadísticamente diferente con respecto a los tratamientos 1 y 2, estos últimos son estadísticamente iguales.

F. Peso seco de la planta.

a) Análisis de varianza para la etapa intermedia (frascos) el peso seco de la planta.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F calculado	P-value
Tratamientos	2	0.006	0.003	0.44	0.44
Error de muestreo	27	0.194	0.007		
Total	29	0.200			
CV	21.78				
Media	0.39				

Para el peso seco de la planta el análisis de varianza muestra que no hubo significancia estadística entre los tratamientos, con un nivel de confianza del 95% y un coeficiente de variabilidad de 21.78 %.

b) Comparación de medias para la etapa intermedia (frascos) entre los tres tratamientos según el peso seco de la planta

Tukey Agrupamiento	Media	Tratamiento
a	0.40620	3
a	0.39200	1
a	0.37080	2

La letra a indica que los tratamientos no se diferencian estadísticamente, según la prueba de Tukey, usando un $\alpha=0.05$.

La comparación de medias por Tukey indica que todos los tratamientos son estadísticamente iguales.

Anexo N°14. Experimento III: Propagación de la piña en biorreactores

A. Altura de las plantas

a) Análisis de varianza para la fase final (biorreactores) según la altura de la planta.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F calculado	P-value
Bloques	4	7.261	1.815	3.21	0.0751
Tratamientos	2	30.062	15.031	26.6	0.0003*
Error experimental	8	4.521	0.565	3.09	0.0031
Error de muestreo	135	24.649	0.183		
Total	149	66.493			
CV	19.30				
Media	2.21				

b) Comparación de medias en la fase final (biorreactores) entre los tres tratamiento según la altura de la planta.

Tukey Agrupamiento	Media	Tratamiento
a	2.5718	T3
a	2.4866	T1
b	1.5824	T2

Los resultados de análisis de varianza muestra que hay significancia estadística entre los tratamientos con un nivel de confianza del 95% y un coeficiente de variabilidad de 19.30%. La comparación de medias por Tukey indica que los tratamientos 1 y 3 son similares, pero diferentes al tratamiento 2.

B. Número de hojas

a) Análisis de varianza para la fase final (biorreactores) según número de hojas.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F calculado	P-value
Bloques	4	1.884	0.471	0.96	0.4803
Tratamientos	2	2.807	1.404	2.85	0.1162*
Error experimental	8	3.939	0.492	6.61	0.0001
Error de muestreo	135	10.054	0.074		
Total	149	18.685			
CV	9.89				
Media	2.76				

b) Comparación de medias en la fase final (biorreactores) entre los tres tratamientos según el número de hojas.

Tukey Agrupamiento	Media	Tratamiento
a	2.9150	T1
a	2.7810	T3
a	2.5820	T2

La letra a indica que los tratamientos no se diferencian estadísticamente, según la prueba de Tukey, usando un $\alpha=0.05$.

Para el número de hojas el análisis de varianza muestra que no hay significancia estadística entre los tratamientos, con un nivel de confianza del 95% y un coeficiente de variabilidad de 9.89%. Por lo tanto la comparación de medias por Tukey indica que los tratamientos son estadísticamente iguales.

C) Diámetro de la planta

a) Análisis de varianza para la fase final (biorreactores) según diámetro de la planta.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F calculado	P-value			
Bloques	4	0.118	0.029	0.52	0.7241			
Tratamientos	2	0.248	0.123	2.18	0.1760*			
Error experimental	8	0.455	0.056	2.51	0.0143			
Error de muestreo	135	3.064	0.022					
Total	149	3.885						
CV	19.26							
Media	0.78							

b) Comparación de medias de la fase final (biorreactores) entre los tres tratamientos según el diámetro de la planta.

Tukey Agrupamiento	Media	Tratamiento
a	0.82800	t1
a	0.78900	t3
a	0.72920	t2

La letra a indica que los tratamientos no se diferencian estadísticamente, según la prueba de Tukey, usando un $\alpha=0.05$.

El análisis de varianza muestra que no hay significancia estadística entre los tratamientos, con un nivel de confianza del 95%. Por lo tanto la comparación de medias por Tukey indica que los tratamientos son estadísticamente iguales.

D) Peso fresco de la planta

a) Análisis de varianza para la fase final (biorreactores) según el peso fresco de la planta.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F calculado	P-value
Bloques	4	1.244	0.311	1.84	0.2139
Tratamientos	2	9.182	4.591	27.21	0.0003*
Error experimental	8	1.349	0.168	4.39	0.0001
Error de muestreo	135	5.182	0.038		
Total	149	16.958			
CV	18.28				
Media	1.07				

b) Comparación de medias de la fase final (biorreactores) entre los tres tratamientos según el peso fresco de la planta.

Tukey Agrupamiento	Media	Tratamiento
a	1.27820	t1
a	1.21300	t3
b	0.72380	t2

Las letras a y b indican grupos de tratamientos estadísticamente diferentes, según la prueba Tukey, usando un $\alpha=0.05$.

El análisis de varianza muestra significancia estadística entre los tratamientos, con un nivel de confianza de 95%. La comparación de medias de Tukey indica que los tratamientos 1 y 3 son similares, pero distintos al tratamiento 2.

E) Peso seco de las plantas

a) Análisis de varianza para la fase final (biorreactores) según el peso seco de la planta.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F calculado	P-value
Bloques	4	0.261	0.065	0.84	0.5358
Tratamientos	2	1.767	0.883	11.37	0.0046*
Error experimental	8	0.622	0.077	4.74	0.0001
Error de muestreo	135	2.212	0.016		
Total	149	4.862			
Coef de variabilidad (%)	22.54				
Media	0.57				

b) Comparación de medias de la fase final (biorreactores) entre los tres tratamientos según el peso seco de la planta.

Tukey Agrupamiento	Media	Tratamiento
a	0.66580	t1
a	0.62140	t3
b	0.41660	t2

Las letras a y b indican grupos de tratamientos estadísticamente diferentes, según la prueba de Tukey, usando un $\alpha=0.05$.

El análisis de varianza muestra significancia estadística entre los tratamientos, con un nivel de confianza de 95%. La comparación de medias por Tukey indica que los tratamientos 1 y 3 son similares, pero distintos al tratamiento 2.

F) Tasa de multiplicación

a) Análisis de varianza para la fase final (biorreactores) según la tasa de multiplicación.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F calculado	P-value
Bloques	4	2.933	0.733	0.20	0.9303
Tratamiento	2	163.600	81.800	22.51	0.0005*
Error experimental	8	29.067	3.633		
Total	14	195.600			
Coef. Variación	29.78				
Media	6.40				

b) Comparación de medias de la fase final (biorreactores) entre los tres tratamientos según la tasa de multiplicación.

Tukey Agrupamiento	Media	Tratamiento
a	11.000	t2
b	4.800	t3
b	3.400	t1

Las letras a y b indican grupos de tratamientos estadísticamente diferentes, según la prueba de Tukey, usando un $\alpha=0.05$.

Para la tasa de multiplicación el análisis de varianza muestra significancia estadística entre los tratamiento, con un nivel de confianza de 95%. La comparación de medias por Tukey indica que el tratamiento 2 tiene una tasa de proliferación superior a los tratamientos 1 y 3.